

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Kateřina Štěpánková

Experimentální model ventrální míšní léze u potkana.
Experimental model of the ventral spinal cord lesion in rats.

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Lucia Machová Urdzíková, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: RNDr. Daniela Horníková, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2020

Kateřina Štěpánková

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce MUDr. Lucii Machové Urdzíkové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, trpělivost, cenné rady, kterými mě po čtyři roky provázela laboratorní praxí a přátelským přístupem. Dále bych chtěla poděkovat svým kolegům z Oddělení Regenerace nervové tkáně, kteří přispěli ke zdárnému dokončení této diplomové práce, a to především Ing. Michaele Petrovičové za odborné konzultace.

Taktéž děkuji doc. RNDr. Pavle Jendelové, Ph.D. za možnost vypracování mé diplomové práce právě na jejím oddělení a pokračování v dalších projektech, které momentálně na oddělení probíhají.

Poděkování patří i konzultantce této diplomové práce RNDr. Daniele Horníkové, Ph.D., která mi dala cenné rady a tipy při dokončování této práce.

Obrovské díky patří také mé rodině a přátelům, kteří mě během mého studia plně podporovali a byli se mnou trpělivi.

Tato práce byla finančně podpořena grantem: Operational Programme Research, Development and Education in the framework of the project “Center of Reconstructive Neuroscience”, s registračním číslem CZ.02.1.01/0.0./0.0/15_003/0000419.

Abstrakt

Poranění míchy (SCI, *spinal cord injury*) je poškození míšní tkáně, které způsobuje trvalé nebo dočasné změny motorických a senzorických funkcí. V humánní medicíně dochází k poranění míchy nejčastěji z ventrální strany, i přesto je většina modelů SCI provedena ze strany dorsální kvůli snazšímu chirurgickému přístupu. Cílem této práce bylo vyvinout klinicky relevantnější, snadno reprodukovatelný a poměrně finančně nenáročný model ventrální míšní léze u potkana, který co nejpřesněji napodobuje SCI u lidí od jeho patologie přes úplnost a úroveň léze až po regenerační mechanismy míšní tkáně. Pro samotný zákrok byl použit upravený 2F Fogartyho katétr, běžně využívaný pro embolektomii, který má na svém konci umístěný balónek. Balónek byl zaveden do anteriorního epidurálního prostoru skrz laminektomii na úrovni obratle Th10. Tím bylo dosaženo finální pozice balónku na úrovni obratle Th8 před *fissura mediana anterior*. Po správném umístění katétru byl balónek rychle nafouknut vodou na objem 10 μ l nebo 15 μ l po dobu 5 minut. Další dvě skupiny – laminektomie (odstranění oblouků obratlů na úrovni Th10) a katétr (umístění katétru do anteriorního epidurálního prostoru bez nafouknutí balónku) – sloužily jako kontroly. Motorické funkce byly vyhodnoceny na základě BBB testu a *ladder walking* testu. V BBB testu bylo pozorováno signifikantní porušení motorických funkcí v 15 μ l skupině v porovnání s ostatními skupinami. *Ladder walking* test ukázal, že zvířata v 15 μ l skupině nebyla schopna přejít přes žebřík, čímž se signifikantně lišila od třech ostatních skupin. Termální hyperalgie byla měřena na Plantar testu. Výsledky u Plantar testu ukázaly asymetrii v termální senzitivitě v obou nohách. Na levé noze nebyla pozorována žádná signifikance mezi skupinami, na pravé noze se projevil signifikantně nižší čas odtažení tlapky z tepelného stimulu ve skupině s lézí o objemu 15 μ l ve 3. a 4. týdnu testování. Množství šedé a bílé hmoty, velikost gliové jizvy a počet motoneuronů byly vyhodnoceny ve všech 4 skupinách. Výsledky ukázaly, že ventrální komprese o objemu 15 μ l vyústily u zvířat v závažný neurologický deficit, signifikantní ztrátu bílé a šedé hmoty okolo středu léze, ale i kraniálním a kaudálním směrem od středu léze, ve větší gliovou jizvu s píkem ve středu léze a ztrátu motoneuronů ve srovnání s kontrolními skupinami a skupinou s lézí o objemu 10 μ l.

Klíčová slova: míšní poranění, model, behaviorální testování, morfometrie, potkan

Abstract

A spinal cord injury (SCI) is a damage to the spinal cord that causes permanent or temporary changes in motor and sensory functions. In humans, the traumatic impact to spinal cord is mostly directed from the ventral part of the spinal column, even though SCI models are principally directed from the dorsal part of the spinal column due to easier surgery. The aim of the work described in this thesis was to develop clinically more relevant, easily reproducible and relatively inexpensive model of the ventral spinal cord lesion in rats which replicates SCI in humans as closely as possible by its pathology, completeness, level and regeneration. For the surgery we used a modification of a balloon- compression technique. The balloon of the 2F embolectomy Fogarty's catheter was placed to the anterior epidural space via laminectomy at the level of T10 and when the final position of the catheter was achieved at the spinal level T8 in front of the anterior median fissure, a balloon was rapidly inflated with 10 μ l or 15 μ l of water for 5 minutes. Other two groups – laminectomy only and ventral placement of the catheter without inflation were used as controls. The motor functions were evaluated by the BBB test and *ladder walking* test. In BBB test we observed significantly impaired motor functions in the 15 μ l group as compared to other groups. The *ladder walking* test showed that animals in the 15 μ l group were not able to cross the ladder which was significantly different from both uninjured groups and 10 μ l group. The thermal hyperalgesia was measured by the Plantar test. This test showed slight asymmetry in thermal sensitivity in both legs. On the left leg we did not observe significant differences between groups, but on the right leg the results showed significantly lower withdrawal time in the 15 μ l injured group in 3rd and 4th week. The tissue sparing, glial scar, number of motoneurons was evaluated in all 4 groups. Results showed that ventral compression made with the volume of 15 μ l resulted in severe neurological deficit, as well as the significant loss of white and gray matter around the center of the lesion and both cranially and caudally, increased size of glial scar with the peak in the center of the lesion and with loss of motoneurons compared to 10 μ l and control groups.

Key words: spinal cord injury, model, behavioral testing, morphometry, rat

OBSAH

Obsah

Prohlášení	2
Poděkování	3
Abstrakt	4
Abstract	5
OBSAH	6
Seznam zkratek	8
1. Úvod	9
2. Anatomie míchy	11
2.1 Celková anatomie páteřní míchy	11
2.2 Míšní tkáň	14
2.2.1 Neurony šedé hmoty míšní	15
3. Patofyziologie míšního poranění	16
3.1 Primární poranění	16
3.2 Sekundární poranění	18
3.2.1 Mechanismus spojený s průtokem krve a porušením vaskularizace	19
3.2.2 Mechanismus spojený se zánětem a reakcí imunitních buněk	20
3.2.3 Mechanismus spojený s apoptózou a demyelinizací	20
3.2.4 Mechanismus spojený s aktivací astrocytů a gliovou jizvou	21
3.2.5 Mechanismus spojený s glutamátovou excitotoxicitou	21
3.2.6 Mechanismus spojený s poškozením prostřednictvím ROS	23
4. Modely SCI	25
4.1 Potkan – nejpoužívanější zvířecí model SCI	26
4.2 Kontuzní model	27
4.3 Transekce a hemisekce	28
4.4 Chemické modely	28
4.4.1 Fotochemický model	28
4.4.2 Excitotoxický model	29
4.5 Kompresní model	30
5. Cíle práce	32
6. Materiál a metody	33
6.1 Experimentální zvířata	33
6.2 Poranění míchy z ventrální strany	35

6.3 Behaviorální testování	40
6.3.1 BBB test.....	40
6.3.2 Plantar test.....	44
6.3.3 <i>Ladder walking</i>	47
6.4 Histologická a imunohistochemická analýza	52
6.5 Statistická analýza	54
7. Výsledky.....	55
7.1 Behaviorální testování	55
7.1.1 BBB test.....	55
7.2.2 Plantar test.....	58
7.2.3 <i>Ladder walking</i>	61
7.2 Histologická a imunohistochemická analýza	63
7.2.1 Zachování šedé a bílé hmoty.....	63
7.2.2 Gliová jizva.....	67
7.2.3 Motoneurony.....	69
8. Diskuse	71
Závěr.....	75
Seznam použité literatury	76
Odborná literatura – knihy	82
Internetové zdroje.....	83
Seznam obrázků	84
Seznam grafů.....	86
Seznam tabulek	86

Seznam zkratek

AMPA – *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*;

α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina

CNS – *central nervous system*; centrální nervová soustava

CXCL1 – *chemokine (C-X-C motif) ligand 1*; chemokinový ligand 1 s C-X-C motivem

CXCL12 – *chemokine (C-X-C motif) ligand 12*; chemokinový ligand 12 s C-X-C motivem

DAG – *1,2-diacylglycerol*; 1,2-diacylglycerol

DAPI – *4',6-diamidino-2-phenylindole*; 4',6-diamidin-2-fenylindol

GABA – *gamma-aminobutyric acid*, kyselina gama-aminomáselná

GFAP – *glial fibrillary acidic protein*; gliální fibrilární kyselý protein

ChAT – *choline acetyltransferase*, cholin acetyltransferáza

IFN- γ – *interferon gamma*; interferon gamma

IH – *Infinite Horizon*; český ekvivalent neexistuje

IL-1,6,8,12 – *interleukins 1, 6, 8, 12*; interleukiny 1, 6, 8, 12

IP₃ – *inositol 1,4,5-trisphosphate*; inositol-1,4,5-trifosfát

NMDA – *N-methyl-D-aspartate*; N-metyl-D-aspartát

NYU – *New York University*; Newyorská univerzita

OSU – *Ohio State University*; Ohijská státní univerzita

PBS – *phosphate – buffered saline*, fosfátový pufr

PIP₂ – *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*; fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát

PLC – *phospholipase C*; fosfolipáza C

RNS – *reactive nitrogen species*, reaktivní formy dusíku

ROS – *reactive oxygen species*, reaktivní formy kyslíku

SCI – *spinal cord injury*, míšní poranění

TNF- α – *tumor necrosis factor α* , faktor nádorové nekrózy α

1. Úvod

Míšní poranění (SCI, *spinal cord injury*) je velmi závažným poraněním, které navždy změní život pacienta nejen po fyzické, ale i po psychické stránce. U pacientů po poranění míchy dochází ke ztrátě nebo poškození motorických i senzorických funkcí. Takto poranění pacienti přicházejí o možnost žít nezávisle na svém okolí, protože samotné míšní poranění není spojeno jen se ztrátou motorických schopností, ale i s dalšími patofyziologickými procesy probíhajícími na úrovni celého organismu i jednotlivých buněk. Poranění míchy tak může způsobit další přidružená onemocnění jako je sexuální dysfunkce, poruchy spojené s vyměšováním, poruchy senzorických funkcí, ba i dokonce perforaci střev. SCI a všechny na něj navázané komplikace tak výrazně snižují kvalitu života pacienta. Je důležité zmínit, že prudce stoupají i náklady na pacientův život. V České republice je takto postiženo asi 150 až 200 lidí ročně¹.

Častěji se SCI objevuje u mužských pacientů, protože nejčastějšími příčinami jsou pády, dopravní nehody a úrazy při adrenalinových sportech¹, činnosti, které provozují ve větší míře muži (oproti ženám).

K poranění míchy může dojít kdykoliv a může potkat kohokoli z nás, proto se i v dnešní době jedná o velmi diskutovanou problematiku. Ve světě běží paralelně několik projektů, které se snaží přijít s řešením pro co největší spektrum pacientů a umožnit tak jejich návrat do běžného života. Aby bylo možné najít, co možná nejuniverzálnější a finančně dostupné řešení, tak je zásadní pochopit patologické, patofyziologické a buněčné události, které stojí za poškozením míšní tkáně a brání regeneračním mechanismům organismu, na které by bylo v budoucnu možné cílit potencionální léčebné postupy. Jednotlivé terapeutické přístupy a cesty se testují na zvířecích modelech.

Absolutní většina modelů, které byly dosud vytvořeny, měla míšní poranění provedené z dorsální strany. A to z důvodu, že mícha je z dorsální strany lépe přístupná a manipulace s míšní tkání je minimální. Přitom klinicky relevantnější je míšní léze, kde mechanický impakt přichází ne z dorsální, ale z ventrální strany. Etiologicky se může jednat o zlomeninu těla obratle, který poraní míchu z ventrální strany, nebo o nádorovou etiologii, kdy nádory často vycházejí z těla obratle, nebo pocházejí z orgánů dutiny břišní, jako je ledvina, tlusté střevo, či metastázy jiných nádorů. Ventrální míšní poranění často způsobuje i výhřez ploténky.

Tato práce se bude zabývat vývojem nového, klinicky relevantnějšího experimentálního modelu míšního poranění u potkana, které bylo provedeno z ventrální strany. Model bude definován na základě popisu behaviorálních motorických a senzorických funkcí u potkana

po SCI. Poraněná míšní tkáň bude analyzována z hlediska formování gliové jizvy, množství poškozené tkáně a celkového počtu motoneuronů.

¹www.spinalcord.cz citováno dne: 19.9.2019

2. Anatomie míchy

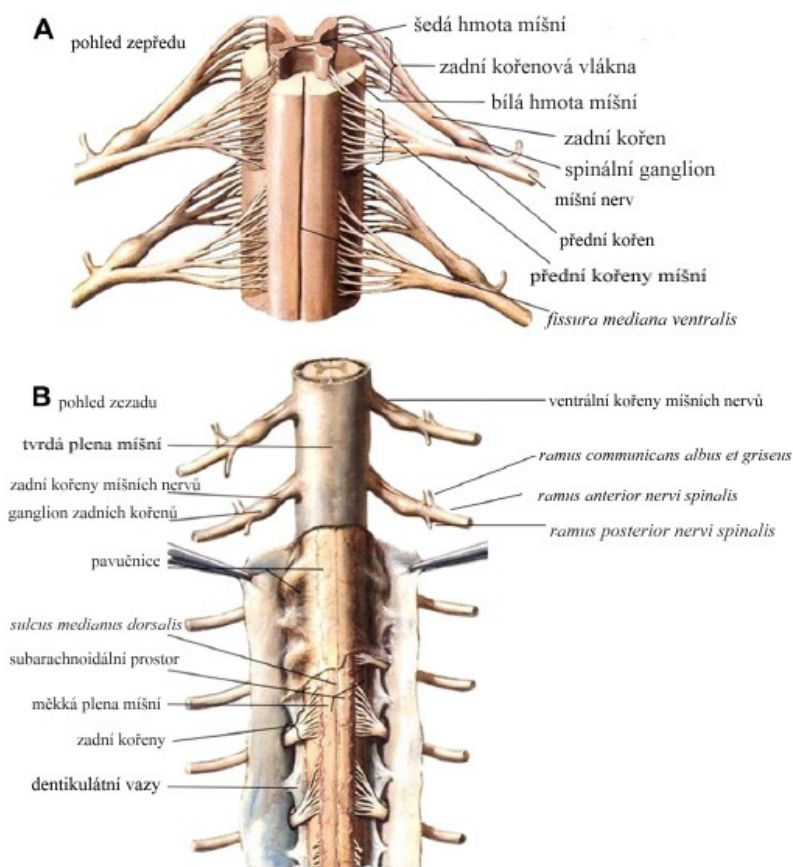
Pátevní mícha má za úkol řídit a kontrolovat kosterní svaly trupu, horních a dolních končetin tím, že přijímá senzorické vstupy z těchto oblastí těla, informace zpracovává a adekvátně odpovídá na příchozí signál prostřednictvím motorických výstupů.

2.1 Celková anatomie pátevní míchy

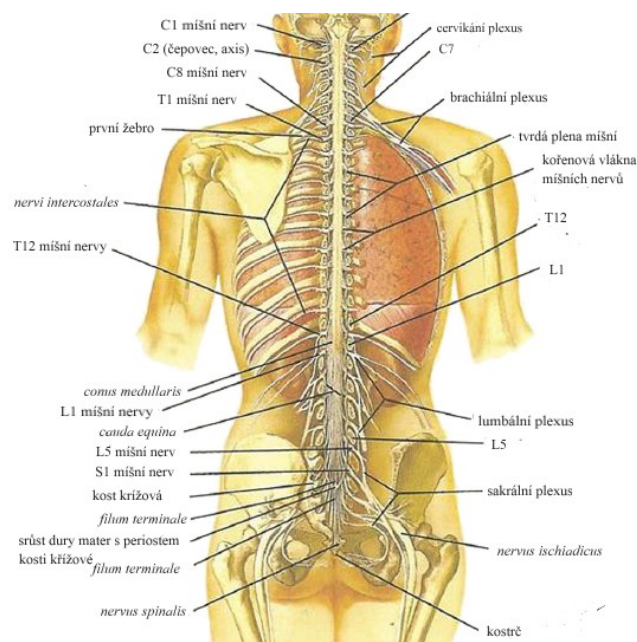
Pátevní mícha je spolu s mozkem a prodlouženou míchou součástí centrální nervové soustavy (CNS). Jde o nejkaudálnější oddíl CNS. Jedná se o provazec nervové tkáně uložený v páteřním kanálu. V kranální oblasti se pátevní mícha rozšiřuje v prodlouženou míchu (součást *truncus cerebri*). U člověka mícha jako taková měří přibližně 40–45 cm (délka je odlišná v závislosti na pohlaví). Začíná v oblasti C1 (horní okraj atlasu) a kaudálně končí (na úrovni L1 a L2) gliovým provazcem (*fillum terminale*), který srůstá s tvrdou plenou míšní (*dura mater spinalis*) a periostem kosti křížové. Na ventrální straně míchy je po celé délce hluboký zářez (*fissura mediana ventralis*). Mícha není stejně dlouhá jako samotný páteřní kanál, je kratší. V rámci embryonálního vývoje mají mícha a páteřní kanál stejnou délku. Od 4. prenatálního měsíce potom začíná páteřní kanál růst rychleji v porovnání s míchou, a tím se stává relativně delším. Kromě toho, že je mícha chráněna páteřním kanálem, tak je zároveň, stejně jako mozek, obalena třemi obaly – tvrdou plenou míšní (*dura mater spinalis*), měkkou plenou míšní (*pia mater spinalis*) a pavučnicí (*arachnoidea spinalis*). Mícha je kotvena pomocí 20 nebo 21 párů dentikulátních vazů do míšních obalů, konkrétně do *pia mater spinalis*.

U člověka se mícha skládá ze 31 segmentů (8 krčních, 12 hrudních, 5 bederních, 5 křížových, 1 kostrční). Míšní segment je úsek míchy, ve kterém se sbíhá vždy 1 pár z 31 párů míšních nervů. Mezi jednotlivými segmenty nejsou ostré hranice, ale v rámci míchy je patrné krční a bederní zvětšení. Tato zvětšení tvoří nervové kořeny pro ruce a pro nohy. Mícha je spojena s ostatními částmi těla prostřednictvím axonů, které z míchy vystupují a tvoří tak míšní nervy. Z povrchu míchy vycházejí kořenová vlákna, která se postupně spojují do předních a zadních kořenů míšních. Přední a zadní míšní kořeny vystupují z páteřního kanálu a spojují se dohromady. Jejich spojením se tvoří samotný míšní nerv (viz obrázek č. 1). Z funkčního hlediska jsou přední kořeny motorické a zadní kořeny senzorické. Z míchy vystupuje 31 párů míšních nervů a dělí se podle toho, z jaké části míchy vystupují (viz obrázek č. 2).

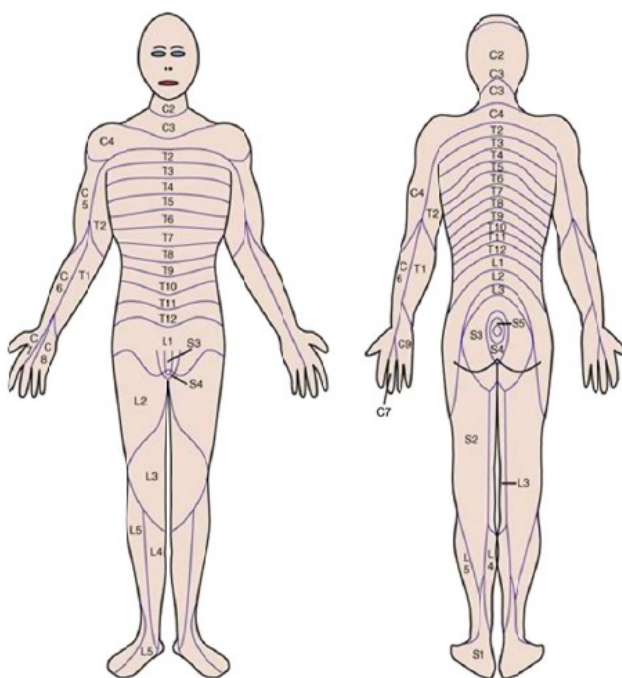
Každý nerv vystupující z určitého míšního segmentu inervuje konkrétní oblast lidského těla. Tato oblast se nazývá dermatom. Prostřednictvím těchto anatomických vztahů je možno veškerý tělesný povrch rozdělit do segmentů čili dermatomů (viz obrázek č. 3).



Obrázek 1. (A) Přední pohled na míchu, který ukazuje kořenová vlákna, míšní kořeny a spojování míšních kořenů do míšního nervu (převzato a upraveno z Bican et al., 2013 dle www.netterimages.com 19. 9. 2019). (B) Zadní pohled na míchu včetně popisu míšních obalů, dentikulárních vazů a dorsálních ganglií (převzato a upraveno z Bican et al., 2013 dle www.netterimages.com 19. 9. 2019).



Obrázek 2. Schématické znázornění vztahů mezi jednotlivými nervy a anatomickými strukturami (převzato a upraveno z Bican et al., 2013 dle www.netterimages.com 19. 9. 2019)

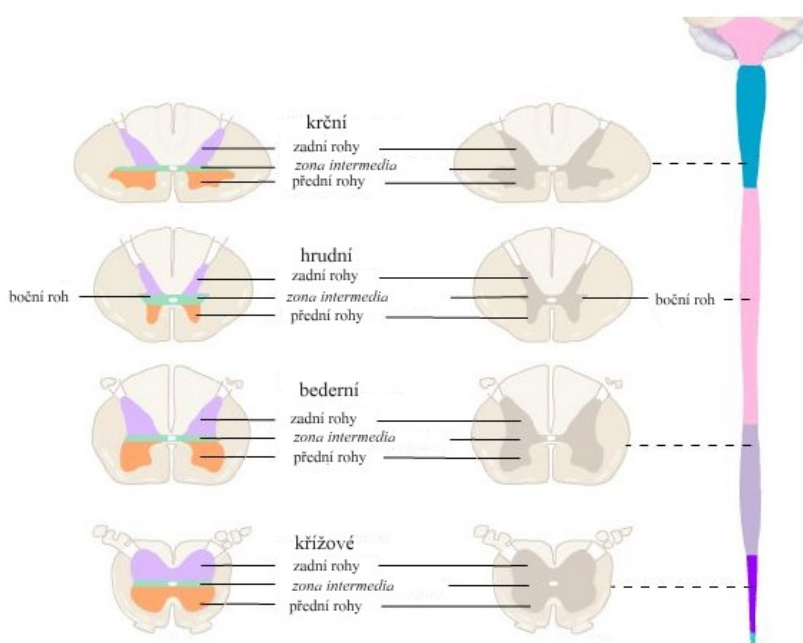


Obrázek 3. Schématické znázornění rozložení jednotlivých dermatomů lidského těla – každému míšnímu segmentu odpovídá určitá oblast těla, která je senzitivně zásobena příslušným míšním nervem (převzato z Bican et al., 2013 dle Squire et al., 2003).

2.2 Míšní tkáň

Vnitřní stavba míchy je nejlépe vidět na příčném průřezu (viz obrázek č. 4). Centrálně je uložena šedá hmota, která má v průřezu tvar písmene H (v literatuře je někdy uváděn tvar „motýla“). Středem šedé hmoty probíhá centrální míšní kanál (*canalis centralis*), který je součástí komorového systému. Šedá hmota vybíhá v zadní a přední míšní rohy. Z anatomického hlediska se oblast centrálního kanálku popisuje jako *zona centralis* a jejím úkolem je spojit pravou a levou polovinu míchy. Šedá hmota obsahuje několik populací neuronů, gliové buňky a husté kapilární síť. Šedá hmota je obklopena hmotou bílou (viz obrázek č. 4).

Mezi šedou a bílou hmotou se nachází *zona intermedia*. Bílá hmota je výstupem předních a zadních míšních kořenů a je tvořena svazky myelinizovaných a nemyelinizovaných axonů, gliovými buňkami a řídkou kapilární sítí. Vlákná, tvořící bílou hmotu, se stejným začátkem, průběhem a zakončením se označují jako míšní nervové dráhy. Tyto dráhy se dělí na vzestupné (ascendentní) a sestupné (descendentní), kdy ascendentní dráhy začínají v míše a míří do mozku, descendentní dráhy jdou opačným směrem.



Obrázek 4. Schématický příčný řez znázorňující rozdíly rozložení bílé a šedé hmoty v jednotlivých míšních segmentech (převzato a upraveno z <https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/> 19. 9. 2019)

2.2.1 Neurony šedé hmoty míšní

Jak bylo zmíněno výše, šedá hmota míšní obsahuje několik populací neuronů. Jednotlivé neurony se od sebe liší podle průběhu a zakončení axonů.

Buňky provazců převažují především v zadních rozích a v *zona intermedia*. Jejich axony vstupují do míšních provazců a míří do mozkového kmene, mozečku a thalamu. Tyto neurony přenášejí senzitivní signály. Dostávají informace z kožních receptorů, pohybového aparátu a vnitřních orgánů.

Interneurony se vyskytují ve všech oblastech šedé hmoty. Nejvíce je jich lokalizováno v *zona intermedia*. Existují dva typy – inhibiční a excitační. Interneurony vytvářejí spojení mezi senzorickými neurony (vedoucími informace ze senzorických receptorů do CNS) a motorickými neurony (vedoucími informace z CNS do příslušných orgánů, svalů a žláz). V interneuronech dochází k usnadnění nebo utlumení základní aktivity míšních segmentů. Interneurony koordinují základní spinální reflexy s úmyslnými pohyby a zároveň zpracovávají informace, které následně putují k motoneuronům.

Motoneurony jsou uloženy v předních míšních rozích a jejich axony vycházejí z míchy předními míšními kořeny. Motoneurony dále rozlišujeme na α -motoneurony a γ -motoneurony. α -motoneurony (somatické) inervují extrafuzální svalová vlákna narozdíl od γ -motoneuronů. Ty mají za úkol inervaci intrafuzálních svalových vláken. Míšní neurony pak pro nervový systém představují vlastně jediné spojení mezi CNS a kosterními svaly.

informace z 1. kapitoly byly čerpány z odborné lékařské literatury.

ČIHÁK, Radomír. Anatomie 3. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2016. ISBN 978-80-247-5636-3.

DYLEVSKÝ, Ivan. Funkční anatomie. Praha: Grada Publishing, 2009. ISBN 978-80-247-3240-4.

DRUGA, Rastislav, Miloš GRIM a Dubový PETR. Anatomie centrálního nervového systému. Praha: Galén, 2011. ISBN 978-80-246-1895-1.

3. Patofyziologie míšního poranění

Jak již bylo popsáno v první kapitole, tak mícha plní v rámci CNS významnou roli tím, že přijímá informace, zpracovává je a na dané podněty i následně odpovídá. Již z toho se dá odvodit, že poranění míchy způsobuje rozsáhlé fyziologické změny, které následně ovlivňují pacientův fyzický i psychický stav. Na míšní poranění je třeba nahlížet jako na komplexní děj, který se sestává z mnoha patologických, patofyziologických, fyziologických a buněčných kaskád, které jsou navzájem propojené. Všechny tyto procesy se dohromady ovlivňují a jejich kombinací vzniká samotné SCI i jeho projev na úrovni organismu (Aki et al., 1984; Anderson et al., 1982; Becker et al., 2003; Fehlings et al., 2001).

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, tak míšní tkáň obsahuje motoneurony a interneurony, jejichž axony procházejí celou délkou samotné míchy a mají za úkol rozvádět informace po celém těle. *Fasciculus gracilis* a *fasciculus cuneatus* (posteriovní část míchy) nesou informace týkající se dotyku a vibrací z horní a dolní části těla. Anteriorní oblast, konkrétně spinothalamický a spinocerebelární trakt, zase nese informace o bolesti, teplotě a propiocepci. Kortikospinální a kortikobulbární trakt umístěný v anteromediální oblasti nese motorické informace z mozku ke končetinám (Klakeel et al., 2015). Z tohoto jasně vyplývá komplexita charakteru celého poranění. Z toho vyplývá, že SCI je, už jen na základě anatomických vztahů, spojeno se ztrátou/poškozením motorických, senzitivních, ale i autonomních funkcí.

Na začátku 20. století přišel Allen (1911) s konceptem dvoustupňového mechanismu SCI. Allen ukázal na svém modelu, že po samotném poranění (primární poranění) dojde k progresivním změnám, které vedou ke spuštění celé řady procesů (sekundární poranění). Tyto následné procesy hrají podstatnou roli v dlouhodobém zdravotním stavu pacienta. A právě kvůli tomu, že SCI je vlastně komplex patofyziologických a biochemických kaskád, kdy k primárnímu poškození dochází nečekaně a je spojeno s následnými procesy přímo odpovídajícími na dané poškození míšní tkáně v organismu, tak je velmi těžké najít univerzální terapeutické řešení (Blesch & Tuszynski, 2008).

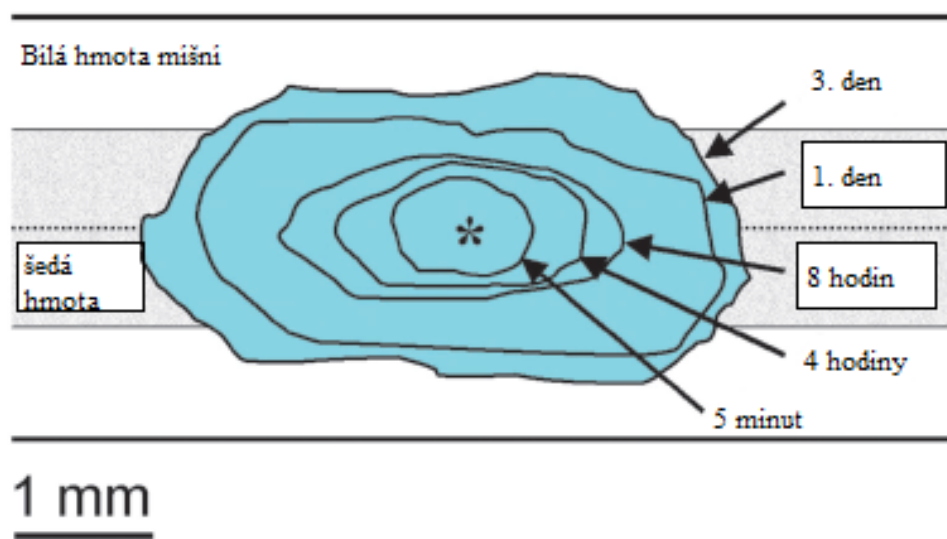
3.1 Primární poranění

Primární poranění souvisí s tím, co se s tkání stane přímo po úrazu. Nejběžnější mechanismus vzniku SCI u lidí je komprese a přetrvávající stlačení míchy. Mícha je uložena v páteřním kanálu, který tvoří mechanickou oporu a ochranu. Při prudkém nárazu dochází k dočasné kompresi tím, že se páteř příliš natáhne. Neznamená to ovšem, že nutně musí dojít

k poškození samotného skeletu páteřního kanálu. Mechanismus vedoucí k distrakci míchy je prohnutí páteře za určité limitní hranice, které páteř ve svém pohybu má. Zároveň může při nárazu také dojít k mechanickému poškození páteřního kanálu. V tomto případě se těla obratlů rozlámou na jednotlivé kostní fragmenty, které mohou dále poškodit vazivovou tkáň. Potom může dojít k natržení nebo roztržení míchy nebo/i durálního vaku až k částečnému (hemisekci) nebo úplnému (transekci) anatomickému míšnímu přerušení (Becker et al., 2003).

Po prvotním traumatu v míše dochází k patologickým změnám, které jsou charakterizovány krvácením, ztrátou mikrocirkulace a vazospasmem (křečovitě zúžení cévy, které při delším trvání může vést k ischemii v příslušné oblasti). Léze se tímto způsobem koncentricky rozšiřuje a zvětšuje (Becker et al., 2003 dle Tator & Fehlings, 1991) (viz obrázek č. 5). Poškození krevních cév, zásobujících míchu, vede k hemoragii a k otoku. Jak mícha otéká, tak vyplňuje prostor páteřního kanálu, tlačí na artérie zásobující míchu krví, dochází k zabránění průtoku krve, to postupně vede k šoku a systémové hypotenzi (Westergren et al., 2001). Primární poranění souvisí i s buněčnou smrtí vyvolanou porušením buněčných membrán, což vede k nekróze nervových buněk v místě léze. Nekrotizující buňky do svého okolí uvolňují řadu látek, které jsou pro okolní tkáň toxické. Po přerušení nervových vláken dochází k lokálnímu bloku ve vedení signálu a k degeneraci těchto vláken.

Mezi mechanismy primárního poranění SCI lze tedy zařadit ischemii, poruchu autoregulace, neurogenní šok, krvácení, poruchy mikrocirkulace, vazospasmus, trombózu a poměrně rychlou buněčnou smrt (Aki et al., 1984; Anderson et al., 1982; Becker et al., 2003; Fehlings et al., 2001; shrnuto v Oyinbo, 2011). Tato primární poranění způsobují poškození šedé hmoty míšní. U neuronů šedé hmoty dochází k redukci myelinu a tím se zhoršuje přenos nervového vzruchu (Young, 1993). Na tyto procesy dále navazuje sekundární poranění.



Obrázek 5. Schéma podélného řezu míchy potkana. Obrázek ukazuje velikost léze 5 minut, 4 hodiny, 8 hodin, 1 den a 3 dny po poranění. Na schématu je patrné koncentrické rozšiřování léze (převzato a upraveno z Becker et al. 2003).

3.2 Sekundární poranění

Primární poškození vlastně vytváří místo, ze kterého se prostřednictvím sekundárních mechanismů SCI, léze rozšiřuje do okolní tkáně (viz obrázek č. 6), což zahrnuje kaskádu cévních, buněčných a biochemických událostí související s běžnými fyziologickými procesy v těle (Simon et al., 2009). Jinak řečeno, primární poranění iniciuje kaskádu fyziologických odpovědí v místě léze a v okolní tkáni. Některé z těchto procesů jsou prospěšné a napomáhají hojení, ale mnohé z těchto odpovědí prospěšné nejsou, spíše naopak vedou k dalšímu poškození tkáně (shrnutí v Oyinbo, 2011). Sekundární poranění tedy vyvolává další poškození (smrt nervové tkáně a rozšíření léze vedoucí ke ztrátám funkcí, které mícha zprostředkovává), limituje regenerační procesy probíhající v organismu a zároveň předpovídá pacientův přetrvávající stav (Dumont et al., 2001). Jde především o odpověď organismu na primární poranění, který se snaží tkáň regenerovat. Charakter této snahy organismu regenerovat míšní tkáň má spíš opačný účinek. CNS je velmi specifická tkáň, a proto tyto mechanismy vedou spíše k jejímu většímu poškození, než bylo samotné primární poranění, ale také přímo brání regeneraci nervové tkáně. Podle Oyinba (2011) je zavedeno přibližně 25 mechanismů sekundárního poranění u SCI. Tyto procesy začínají několik málo vteřin po primárním poranění a mohou přetrvávat až několik měsíců (Tanhoffer et al., 2007). Jedná se především o změny v průtoku krve, kdy v místě poranění dochází k poškození vaskularizace a krev prosakuje z

místa poranění i do okolní tkáně, v místě poranění probíhá i silná imunitní reakce, která postupně způsobuje zánět, dochází k demyelinizaci a apoptóze buněk nervové tkáně, astrocyty jsou aktivovány a vytvářejí jizvu, která má zabránit šíření fyziologických kaskád dál do zdravé tkáně, uvolňuje se čím dál tím větší množství neurotransmiterů z poškozených buněk. Toto množství neurotransmiterů je spojeno s otevíráním iontových kanálů a pro zdravé buňky je toxické. Jde zejména o glutamát, který přes N–metyl–D–aspartátové (NMDA) receptory pouští do buněk Ca^{2+} . Vápenaté kationty v organismu fungují jako druzí poslové a účastní se v celé řadě buněčných procesů a aktivují velké množství nejrozličnějších enzymů včetně endonukleáz a fosfolipáz, které vedou ke štěpení DNA a fosfolipidů buněčné membrány. Posledním a zásadním mechanismem jsou volné kyslíkové radikály (ROS, *reactive oxygen species*), které spouštějí řetězové reakce. Společně tyto kaskády ovlivňují fyziologické procesy v organismu a exacerbaci poškození neuronů po primárním poranění (shrnutí v Liverman et al., 2005; Ng et al., 2011; shrnutí v Oyibo, 2011).

3.2.1 Mechanismus spojený s průtokem krve a porušením vaskularizace

Primární poranění způsobí poškození tkáně v bezprostřední oblasti léze, které vede k lokálnímu krvácení a k ischemii. Ischemie může být vyvolána sražením krve, případně vazospasmem. Poškození cévního zásobení míchy následně vede k otoku tkáně, otok může tlačit na poraněnou část, což tkáň ještě více poškozuje. Výsledkem těchto patofyziologických procesů může být nekróza buněk obklopující bezprostředně místo úrazu. Buňky nemají dostatečný přísun živin přes krevní řečiště, a tím nekrotické poškození dále expanduje. Zároveň při poranění cév dochází k narušení bariéry mezi krví a míchou. Bariéra je tvořena endotelovými buňkami, pericyty a astrocyty. Za fyziologických podmínek tyto buňky chrání a vyživují míšní tkáň. Porušení této bariéry na jedné straně vystavuje nervovou tkáň krevním elementům, které urychlují nekrózu a na druhé straně způsobuje, že nervová tkáň hladoví kvůli nedostatku dostupných živin, které nemohou být do míšní tkáně dopravovány krevním řečištěm (shrnutí v Liverman et al., 2005; Choo et al., 2007; shrnutí v Oyibo, 2011; Ng et al., 2011; Lee et al., 2003).

3.2.2 Mechanismus spojený se zánětem a reakcí imunitních buněk

Za fyziologických podmínek procházejí buňky bariérou mezi míchou a krví pouze v omezeném množství. Při porušení bariéry buňky imunitního systému začnou vstupovat ve velkém počtu do míšní tkáně (shrnutí v Oyinbo, 2011; Ng et al., 2011). Tyto buňky vyvolávají zánět, který je obecně adaptivní reakcí a homeostatickou odpovědí organismu na lokální poranění. Zároveň je to nástroj limitující opravu poraněné tkáně, pokud jsou tedy fyziologické kompenzační mechanismy stále funkční (Popovich et al., 1997; shrnutí v Anwar et al., 2016). Vstup velkého počtu buněk imunitního systému iniciuje sekundární poranění doprovázené zánětlivými kaskádami vyvolané v první řadě neutrofily, monocyty (měnícími se na makrofágy) a dále buňkami nervové tkáně jako jsou například astrocyty a mikroglie, které mají schopnost fagocytovat. T a B lymfocyty se těchto imunitních reakcí sekundárního poranění také účastní. Buňky imunitního systému uvolňují prozánětlivé cytokiny (IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 a IL-12) a chemokiny (CXCL1, CXCL12), dále pak oxid dusnatý, glutamátergní ionty, proteázy štěpící extracelulární matrix a proteiny komplementu. Tato kaskáda vyvolává nekrózu a apoptózu buněk zdravé, primárním mechanismem nepoškozené tkáně (Popovich et al., 1997; Allan & Rothwell, 2003; Hendrix & Nitsch 2007; shrnutí v Oyinbo, 2011; Zhang et al., 2012; shrnutí v Anwar et al., 2016).

3.2.3 Mechanismus spojený s apoptózou a demyelinizací

Po kaskádě reakcí vyvolané odpovědí imunitního systému bylo zjištěné, že okolí léze prochází akutní a subakutní apoptózou (shrnutí v Oyinbo, 2011; Zhang et al., 2012). Tento proces je spojen se zvýšenou koncentrací Ca^{2+} u buněk míšní léze. Každopádně apoptóza byla pozorována i v neuronech a oligodendrocytech vzdálenějších od léze, až tam, kam se poškození Ca^{2+} nemohlo dostat. To naznačuje, že apoptóza těchto vzdálenějších buněk od místa léze musí být stimulována jinými mechanismy sekundárního poranění (shrnutí v Oyinbo, 2011). Apoptóza oligodendrocytů vede k demyelinizaci neuronů v okolí poškozené tkáně. Právě oligodendrocyty mají za úkol tvořit myelin okolo axonů v CNS. Jeden oligodendrocyt vytváří myelinovou pochvu pro více axonů najednou. Jakmile neurony ztratí myelinovou pochvu, tak již nejsou chráněny před škodlivými vlivy a jsou vystaveny degradaci prostřednictvím ROS (shrnutí v Oyinbo, 2011). Zároveň ztráta těchto buněk zhoršuje komunikační schopnosti míchy (shrnutí v Oyinbo, 2011; Zhang et al., 2012).

Největší počet demyelinizovaných axonů byl pozorován 24 hodin po poranění. Většina holých axonů byla poté buď již mrtvá, nebo začínala degenerovat (Totoiu et al., 2005). Přibližně po 14 dnech postupně dochází k remyelinizaci díky produkci nových oligodendrocytů. V míše existují progenitorové buňky, které tak tvoří hlavní zdroj pro vznik nových oligodendrocytů. Tato produkce pokračuje několik měsíců. Tloušťka myelinového obalu však nikdy nedosáhne původních rozměrů (Casha et al., 2001; shrnuto v Liverman et al., 2005; Totoiu et al., 2005; McTigue, 2008; Hesp et al., 2015).

3.2.4 Mechanismus spojený s aktivací astrocytů a gliovou jizvou

Po SCI dochází k aktivaci astrocytů. Reaktivní astrocyty se začínají shromažďovat podél okrajů míšní léze (Sofroniew, 2014). Tyto astrocyty hypertrofují a prolifерují. Jejich úkolem je vytvoření husté, vláknité sítě. Tato síť má za úkol oddělit poškozenou a zdravou tkáň od sebe a tím zabránit dalšímu šíření léze do okolí (Verkhratsky et al., 2013; Sofroniew, 2014). Síť, kterou astrocyty vytvářejí, zároveň obnovuje bariéru mezi míchou a krví (Sofroniew, 2005). Zpočátku má astroglióza velmi pozitivní účinek, ale ten je pouze krátkodobý. Z dlouhodobého hlediska je reakce astrocytů negativní. Vytváří se gliová jizva, která brání opětovnému růstu axonů. Jizva získává roli mechanické bariéry, přes kterou axony nemohou prorůst, tím je zabráněno funkčnímu zotavení míchy po SCI (Sofroniew, 2005, 2015; Sofroniew & Vinters, 2010). Tento proces je dobře patrný již po 1 týdnu od SCI (Chung et al., 2014).

3.2.5 Mechanismus spojený s glutamátovou excitotoxicitou

Glutamát je hlavní excitační neurotransmiter v CNS. Jeho excitační účinek je známý již od 50. let 20. století. Za normálních fyziologických podmínek je glutamát skladován v synaptických váčcích presynaptických neuronů. Po splynutí váčků dochází ke stimulaci postsynaptického neuronu. Glutamátová transmise netrvá příliš dlouho. V rámci postsynaptické terminály existují tři typy ionotropních glutamátových receptorů – receptory pro α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionovou kyselinu (AMPA), pro kainátovou kyselinu (kainátové) a NMDA. Tyto receptory jsou významné iontové kanály v buněčné membráně neuronů. AMPA a kainátové receptory jsou iontovými kanály pro Na^+ a K^+ . NMDA receptory narozdíl od kainátových a AMPA receptorů propouští kromě Na^+ a K^+ i Ca^{2+} . NMDA receptory mají iontový kanál blokováný Mg^{2+} . Jde o napětově závislý mechanismus. Při stimulaci glutamátem dojde k influxu Na^+ do buňky a efluxu K^+ z buňky díky otevření AMPA a kainátových receptorů. Dojde ke změně napětí na membráně a uvolnění Mg^{2+} z NMDA a tím

pádem mohou Ca^{2+} vtéct do buňky. Po vylití do synaptické štěrby je glutamát (za fyziologických podmínek) poměrně rychle vychytáván astrocyty a ostatními gliovými buňkami a je enzymem glutaminsyntetázou katalyzovaná jeho přeměna na glutamin. Tento mechanismus za fyziologických podmínek zabraňuje hromadění glutamátu a zabraňuje poškození neuronů (shrnutí v Meldrum, 2000; Hausmann, 2003).

Za patofyziologických podmínek dochází k nadměrnému uvolňování glutamátu do extracelulárního prostoru. Je to způsobeno především tím, že z nekrotizujících buněk se vylévají zásoby glutamátu uložené v synaptických váčcích. Zároveň při poškození buněk dochází k rozhození iontové homeostázy. Iontová homeostáza může kromě jiného ovlivnit i správnou funkci glutamátových transportérů, které mají za úkol glutamát ze synaptické štěrby vychytávat. Když glutamát není vychytáván, tak difunduje extracelulárním prostorem a stimuluje glutamátové receptory. Nejvíce ohrožené jsou buňky s vysokým počtem AMPA a NMDA receptorů (především neurony a oligodendrocyty). Tato stimulace způsobí vstup Ca^{2+} do buňky a následné zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} . Ca^{2+} jsou významným druhým poslem, který aktivuje celou řadu buněčných kaskád včetně aktivace endoproteáz, fosfolipáz a proteáz (například kalpain). Tyto enzymy způsobují poškození buněčného cytoskeletu, membrány a DNA (Hausmann, 2003; shrnutí v Park et al., 2004; shrnutí v Platt, 2007; shrnutí v Oyibo, 2011; McTigue, 2008). Příliš vysoká koncentrace Ca^{2+} v buňce má za následek i poškození mitochondrií. Kvůli narušení iontové rovnováhy se snaží mitochondrie fungovat jako pufrací systém v buňce. Ca^{2+} vstupují do mitochondrií, aby došlo ke snížení Ca^{2+} koncentrace v intracelulárním prostoru. Mitochondrie začínají bobtnat, postupně mizí krysty až dochází k rozpadu vnější mitochondriální membrány. Z mezimembránového prostoru se do cytoplazmy uvolňuje cytochrom c, který ve spolupráci s aktivátorem apoptózy Apaf-1 a prokaspázou 9 (prekurzor enzymu ze skupiny cysteinových proteáz, které po aktivaci vedou k rozpadu buňky) umožní nastartování procesu buněčné smrti přes vnitřní cestu apoptózy a aktivací kaspáz 3 a 9 (Zhang et al. 2014). Zároveň dochází k selhání elektronového transportního řetězce, tím se zvyšuje produkce ROS a RNS (reactive nitrogen species; reaktivní formy dusíku) (Azbill et al. 1997). Všechny tyto mechanismy nakonec vedou k apoptóze buňky.

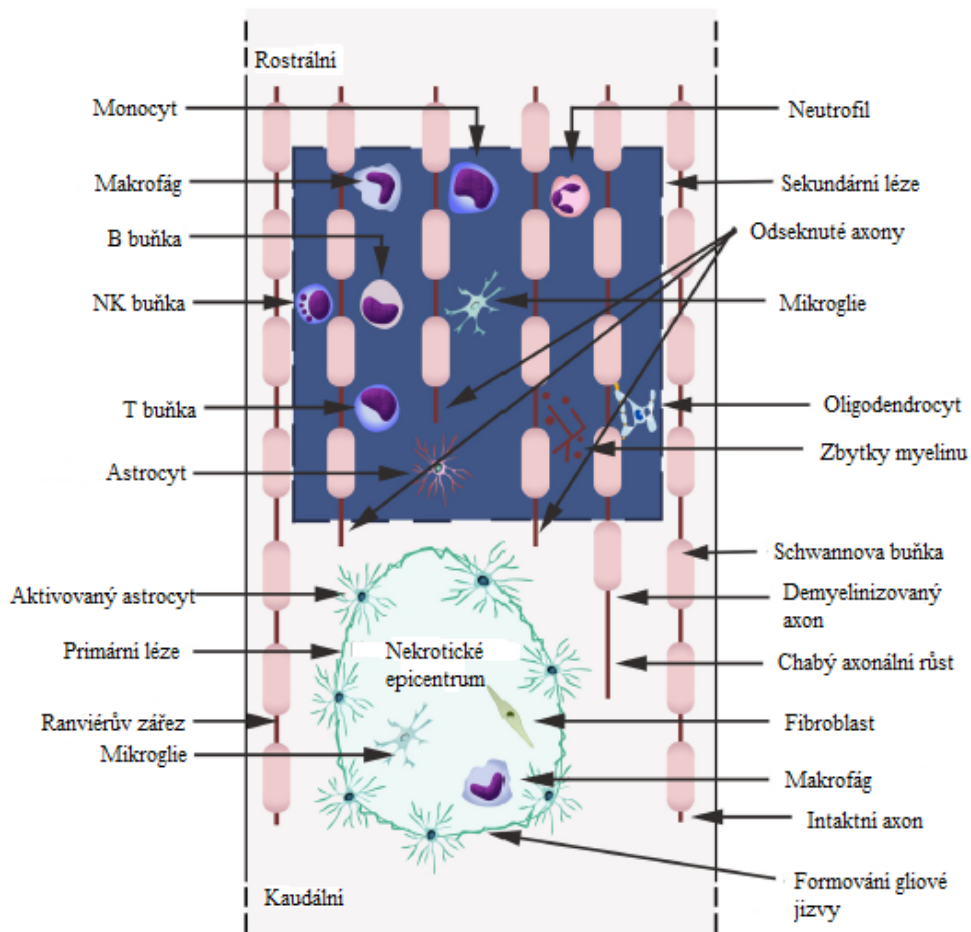
3.2.6 Mechanismus spojený s poškozením prostřednictvím ROS

V rámci sekundárního poranění je tkáň vystavena i účinku RNS a ROS. Za normálních fyziologických podmínek jsou tyto radikály produkovány v malém množství a umožňují správné fungování organismu, účastní se při přeměně a uvolňování energie, která je potřebná pro životní procesy. Z chemického hlediska jsou tyto radikály odvozené od peroxidu vodíku, superoxidů a oxidu dusného. Jejich vznik v buňce je přísně regulován, právě aby nedošlo k poškození buněk vysokou reaktivitou těchto radikálů (Jia et al., 2012). Vznik ROS a RNS je regulován prostřednictvím mitochondrií a přítomností různých přirozeně se vyskytujících antioxidačních molekul a enzymů. Pokud se vymknou jakékoliv kontrole, stávají se pro organismus škodlivými. Antioxidační mechanismy jsou přirozenou schopností organismů bránit se vůči účinku ROS a RNS. Například neurony umí ničit radikály enzymaticky, ale i neenzymaticky. Mezi enzymy, které katalyzují přeměnu ROS patří superoxid dismutáza, kataláza, glutathion peroxidáza a glutathion reduktáza. Mezi neenzymatické antioxidační mechanismy potom řadíme například některé vitamíny jako je α -tokoferol a kyselina L-askorbová, které umí vychytávat volné radikály (Schreiber & Trojan, 1990), dále potom karotenoidy a β -karoten (Surai et al., 1999). Další látky vychytávající ROS a RNS jsou například nikotinamid, koenzym Q, bilirubin, cystein, kyselina močová, melatonin, kyselina lipoová, glutathion a stopové prvky (Se, Zn, Cu) (Sener et al., 2005).

Při SCI však nedochází k regulaci vzniku a odbourávání ROS a RNS (Xu et al., 2005; Jia et al., 2012). Předpokládá se, že díky nadměrné stimulaci glutamátem a vtoku Ca^{2+} do buňky dojde k dysregulaci mitochondrií. Poškozené mitochondrie tvoří daleko více ROS a RNS. Dalším producentem radikálů ROS jsou fagocyty buňky imunitního systému. Ke vzniku radikálů ROS přispívá i nekrotizující tkáň, kdy se obsah lysozomů a peroxisomů vylévá do extracelulárního prostoru (Jia et al., 2012).

Volné kyslíkové i dusíkaté radikály jsou daleko reaktivnější než molekuly v základním stavu. Vyvolávají tak další poškození tkáně například zprostředkovanou přes aktivaci proteáz. Proteázy potom poškozují proteiny a nukleové kyseliny. Největší poškození se týká membránových fosfolipidů (Xu et al., 2005; shrnuto v Oyinbo, 2011; Jia et al., 2012). Dochází k oxidaci membránových lipidů, která vede ke změně stability membrány. Membrána se doslova trhá a celá kaskáda končí buněčnou smrtí (Xu et al., 2005; shrnuto v Oyinbo, 2011). Může dojít i k lipidové peroxidaci polynenasycených mastných kyselin přítomných v membránách, která vede ke vzniku malondialdehydu, který poškozuje některé důležité metabolické enzymy (Azbill et al. 1997). Rovněž může dojít i k poškození Na^+/K^+ -ATPázy

(Jamme et al., 1995). ROS zastávají také funkci druhých posílů. Mohou tedy aktivovat prozánětlivé cytokiny a pro-nekrotické faktory (Xu et al., 2005; shrnuto v Oyinbo, 2011).



Obrázek 6. Schéma zachycující primární a sekundární poranění (převzato a upraveno z Anwar et al. 2016).

4. Modely SCI

Modely SCI se ukázaly jako nezbytné nejenom pro zkoumání účinnosti nejrozličnějších terapeutických postupů, ale i pro lepší pochopení toho, co se s míchou děje z pohledu molekulární, buněčné biologie a patofyziologie. Modely SCI se v průběhu minulého století vyvíjely a zdokonalovaly. Od doby, kdy Allen (1911) přišel s prvním modelem, kdy byl odstraněn oblouk jednoho z obratlů (laminektomie) a na místo, kde byla mícha odhalená bylo puštěno závaží o známé váze vyvolávající náraz. Tento mechanický náraz způsobil poškození míchy, které bylo podobné u poranění lidských pacientů. Během dalších desítek let se modely vyvíjely, aby experimentálně vyvolané poškození míchy mělo rysy, co nejvíce podobné skutečnému lidskému poranění. Všechny tyto modely se liší hned z několika hledisek. Například podle použitého zvířete, u kterého bylo způsobeno poškození nebo podle mechanismu provedení samotného SCI.

Nejpoužívanějším zvířecím modelem je potkan, u kterého byla vyvinuta celá řada modelů, kterými lze vytvořit SCI v laboratorních podmínkách. Potkani jsou vhodným modelovým organismem nejenom z důvodu poměrně nenáročné péče, ale i z pohledu finanční dostupnosti. Obecně se jedná o běžná laboratorní zvířata a během studií se ukázala funkční, elektrofyziologická a morfologická podobnost s SCI u lidí (Metz et al., 2000). Myší modely se využívají například pro genetické studie (Jakeman et al., 2000), ale při vytváření modelu SCI je potkan daleko vhodnější kvůli své velikosti a jednodušší manipulaci během operačního zákroku.

Dalšími laboratorními zvířaty pro vytvoření modelu SCI byly použiti kosmani, makaci a kotulové. Primáti opět více přiblížili pohled vědců na fungování CNS (mozku především) u člověka. Primáti oproti hlodavcům mají lidem daleko podobnější anatomické, ale i funkční uspořádání v mozku (Iwanami et al., 2005). Příkladem se uvádí kortikospinální trakt, který je u hlodavců lokalizován v posteriorním funiculu, za to u primátů a člověka je v laterálním funiculu nebo funiculu laterálním a anteriorním současně (Lemon et al., 2004).

Opičí model by byl tedy daleko relevantnější, ale při používání primátů je daleko náročnější správná a legislativně opatřená péče a zároveň se jedná o daleko finančně náročnější laboratorní zvířata. Primáti se využívali například při studiích o mechanismu poškození lidského mozku a při studiu Alzheimerovy choroby (Roeling et al., 1995). Pro vytvoření modelů SCI nejsou nejvhodnějšími právě z hlediska legislativy, dostupnosti, péče a ceny. V rámci legislativy je přesně řečeno, jaké podmínky je třeba dodržet v chovech, na stáří daných primátů,

a tak podobně¹. Míšní poranění je modelováno rovněž na větších zvířatech – králících, psech a prasatech, a to v preklinických studiích s potenciálním transferem do humánní medicíny.

4.1 Potkan – nejpoužívanější zvířecí model SCI

Potkan (*Rattus norvegicus*) patří mezi nejpoužívanější laboratorní zvířata. Potkan je využíván především proto, že celkově péče o něj a manipulace s ním není příliš náročná a jeho pořizovací náklady jsou poměrně nízké. Z hlediska výzkumu SCI jsou potkani vhodnějším modelovým organismem než myši nebo jiní hlodavci. Oproti myším jsou potkani větší a tím jsou i veškeré operativní zákroky snadnější. Současně jsou proti ostatním používaným hlodavcům daleko odolnější, což znamená, že dokážou, víceméně bez problémů, přežít a zregenerovat se i po poranění míchy.

Ve výzkumu se využívá několik inbredních kmenů – Wistar, Sprague–Dawley, Long–Evans, Lewis, Fischer atd. V rámci každého projektu by se měl využívat pouze jeden kmen, protože každý z kmenů může exprimovat jiné množství proteinů, co se týče imunitních odpovědí a regeneračních procesů, tím by při vyhodnocování vznikaly jisté odchylky a chyby (Schmitt et al., 2006).

Míšní léze se provádějí nejčastěji v thorakální oblasti, někdy i v oblasti cervikální. Z klinického hlediska je poranění v cervikální oblasti běžnější, vzniká při adrenalinových sportech i dopravních nehodách (Dunham et al., 2010). Každopádně u potkanů je provádění SCI v cervikální oblasti nepraktické kvůli následné péči. Potkani s SCI v cervikální oblasti přestávají ovládat jak zadní, tak přední končetiny. Takovým modelům se musí potom péče o ně přizpůsobit – musí být manuálně krmeni, napájeni i močeni. Zvířata s poraněním v thorakální oblasti nemohou ovládat pouze zadní končetiny a následná mortalita zvířat je daleko nižší (Pearse et al., 2005).

¹ Sbírka zákonů ČR, Předpis č. 419/2012 Sb. Vyhláška o ochraně pokusných zvířat

4.2 Kontuzní model

Slovo kontuze má základ v latinském *contusio* a znamená pohmoždění. Tento model je vytvářen na základě pohmoždění míšní tkáně. Vychází se z toho, že SCI často vzniká prudkým úderem do páteře. Tyto modely jsou vyvíjeny úderem o známé síle na míchu. Existuje několik možností, jak je tento model vytvářen. Buď se na odhalenou míchu působí kovovou tyčinkou z výšky, tato výška je předem definovaná podle toho, jak moc velkého poranění chce examinátor docílit (Beattie et al., 1997; Onifer et al., 2007) nebo se počítá přímo s mírou stlačení míchy, nikoliv pouze s výškou, z jaké na míchu bylo působeno (Pearse et al., 2005). U jiného typu kontuzního modelu se dá na začátku určit síla, jakou chceme míchu stlačit. Těleso je spouštěno po jednotlivých krocích. Celkový pohyb se jeví jako plynulý, protože jednotlivé kroky jsou malé a rychlé. Senzor po každém kroku měří sílu a porovnává, zda souhlasí se zadaným parametrem. Pokud ne, je zařazen další krok (Scheff et al. 2003). Kontuzní model se dá vytvořit i tlakem vzduchu, pomocí tzv. *air gun* (Marcol et al., 2012).

V současnosti jsou dostupná tři mírně odlišná zařízení. Dvě z těchto zařízení byla vyvinuta na amerických univerzitách, konkrétně na Univerzitě v New Yorku (dále jen NYU dle New York University), na Univerzitě v Ohiu (dále jen OSU dle Ohio State University) a třetí zařízení je nazývané jako Infinite Horizon (dále jen IH).

Princip NYU spočívá v tom, že jeho součástí je kovová tyčinka o hmotnosti 10 gramů. Tyčinka musí být pečlivě vycentrována nad odhalený povrch míchy. Následně je opatrně snižována, až se její špička dotkne *dura mater* – v tento moment je úroveň tyčinky označována jako nulová. Tyčinku je pak možné pouštět z výšky 6,25; 12,5; 25 nebo 50 mm. Platí zde přímá úměra výšky, z jaké je tyčinka spuštěna, a poškození míchy (Beattie et al. 1997). Jako proměnná v tomto vztahu vystupuje výška, ostatní faktory, mezi které patří například míra stlačení míchy, se dají z použité výšky vypočítat.

Princip OSU je velmi obdobný principu NYU. Jediný rozdíl je v tom, že proměnnou zde není výška, z jaké je na míchu působeno, ale míra samotného stlačení míchy. Povrch míchy je brán opět jako výchozí bod. Pokud dojde ke stlačení míchy o 0,80 mm vznikne mírné, o 0,95 mm středně závažné a o 1,10 mm vážné poranění míchy. Důležité je také zmínit, že doba komprese nepřesahuje 20 ms (Pearse et al., 2005). Zařízení je po celou dobu zákroku řízeno počítačem. Těleso po dopadu od míchy neodskakuje (při NYU ano), ale je aktivně staženo, což pomáhá odstranění chyby měření, která by mohla vzniknout. Nevýhodou tohoto modelu je však samotný ukazatel závažnosti SCI – míra stlačení míchy. Pokud by došlo, během stlačení,

k pohybu míchy v rámci páteřního kanálu, tak by to vedlo k nepřesným výsledkům (Scheff et al., 2003).

U IH je jako proměnná aplikovaná síla. Těleso je spouštěno na míchu postupně po jednotlivých malých, ale velmi rychlých krocích. Tím je docíleno toho, že se celý pohyb jeví jako plynulý. Po každém kroku senzor automaticky kontroluje, zda bylo dosaženo požadované síly. V případě, že ne, tak je zařazen další krok, pokud ano, je těleso okamžitě zdviženo (Scheff et al., 2003).

Počítačově řízené kontuzní modely SCI jsou velmi přesné a umožňují nastavení konkrétních biomechanických parametrů a jejich zpětné kontroly.

4.3 Transekce a hemisekce

U transekčních a hemisekčních modelů dochází k úplnému (transekce) nebo částečnému (hemisekce) přerušení míchy. Tyto modely jsou využívány především v tkáňovém inženýrství, například při zkoumání regenerace jednotlivých neuronů po poranění (Onifer et al., 2007). Využívají se především pro hodnocení míry regenerace axonů a následného obnovení funkce neuronů. Tyto modely nejsou nejvhodnějším způsobem pro sledování komplexní patofyziologie spojené s SCI. Důležitá je závažnost a úroveň SCI, což jsou faktory, které zcela rozhodují o použitelnosti a interpretaci kvantitativních výsledků motorických, senzorických a autonomních funkcí (Onifer et al., 2007). Z pohledu klinické medicíny nejsou transekce běžným typem poranění u člověka. Vznikají zcela výjimečně, například u řezných poranění, nebo po postřelení. (Heimburger, 2005).

4.4 Chemické modely

Samotné míšní poranění je spojeno s dalšími sekundárními procesy, které přímo souvisejí s SCI a jsou jeho neoddělitelnou součástí. Modely vytvořené pomocí chemických látek se snaží napodobit procesy sekundárního poškození míchy, například glutamátovou excitotoxicitu, nebo poškození ROS. Tyto modely se využívají pro zkoumání jednotlivých molekulárních mechanismů SCI včetně důsledků různých terapií.

4.4.1 Fotochemický model

Fotochemický model využívá toho, že některá barviva jsou citlivá na světlo a po ozáření světlem o určité vlnové délce přecházejí do excitovaného stavu. Excitovaný stav atomu nebo molekuly znamená, že jeden nebo více elektronů přešlo do vyšší energetické hladiny. V atomu

či molekulách se poté zvyšuje počet nepárováných elektronů a tím dochází ke zvýšení reaktivity dané látky. K vyvolání míšního poranění se často využívá například bengálská červen, která se po ozáření světlem o vlnové délce 540 nm stává zdrojem ROS (Verdu et al., 2003). Přítomné ROS inhibují činnost katalázy a superoxid dismutázy (Kim et al., 2001), což jsou důležité enzymy pro správné fungování imunitního systému. V míše jsou tyto procesy následkem hemoragie, edému, nekrózy šedé hmoty, poškození myelinu a dystrofii axonů (Verdu et al., 2003). Jde tedy o mechanismy, které odpovídají patofyziologii SCI u lidí. Kromě bengálské červeně existují i jiná barviva, která mají podobné účinky (von Euler et al., 1996).

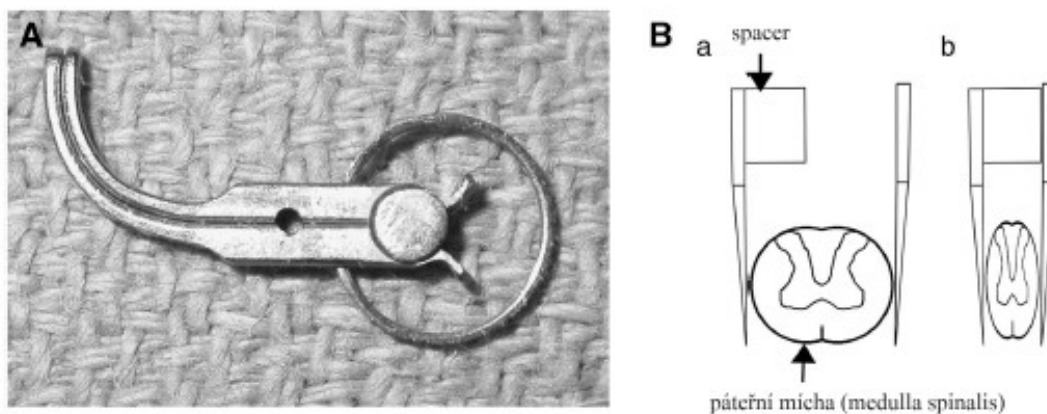
4.4.2 Excitotoxický model

Při poranění míchy se extracelulárně zvýší koncentrace glutamátu. Extracelulární glutamát prodlužuje dobu depolarizace a oddaluje iniciaci kaskády buněčných procesů, které postupně vedou až k apoptóze. Při poškození neuronů se glutamát uvolňuje ze synaptických váčků, kde je skladován. Pokud se na buňku vylije veliké množství glutamátu, tak se jedná o mechanismus pro ni toxický (Liu et al., 1999). Při vytváření excitotoxického modelu se nejčastěji využívá quisqualátová kyselina (agonista ionotropních glutamátových receptorů i metabotropních glutamátových receptorů) (Vierck et al., 2013). Ionotropní receptory regulují otevírání napětově závislých iontových kanálů a umožňují tak vtok Ca^{2+} z extracelulárního prostoru do buňky. Metabotropní receptory aktivují fosfolipázu C (PLC). PLC štěpí membránový protein fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP_2) na 1,2-diacylglycerol (DAG) a inositol-1,4,5-trifosfát (IP_3). IP_3 i DAG mají důležitou roli v signalizaci. Mezitím, co DAG zůstává ukotven v membráně, tak IP_3 difunduje od membrány až k endoplazmatickému retikulu, kde nasedá na ligandem řízený iontový kanál a jako druhý posel umožňuje výlev Ca^{2+} z endoplazmatického retikula. Tím dojde ke zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} (Liu et al., 1997a). U těchto modelů se tedy aplikuje taková látka, která způsobí zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} , které fungují jako druzí poslové. V buňce pak spouští nejrozličnější kaskády dějů, které vedou k poškození nervové tkáně na požadované úrovni míchy, kam byla látka aplikovaná (Vierck et al., 2013). Excitotoxický model je vhodný pro studování mechanismů, které jsou zodpovědné za změny v senzorických funkcích a za vnímání bolesti, které se mohou projevit i u pacientů po SCI (Yeziarski et al., 1998).

4.5 Kompresní model

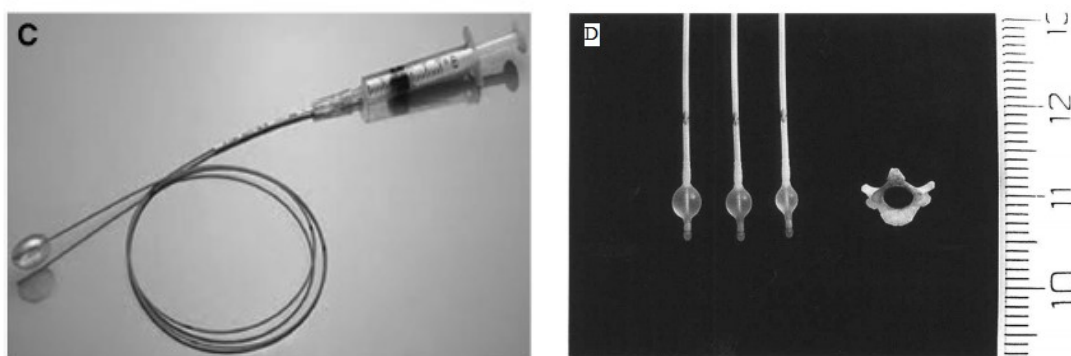
Kompresní model je velmi oblíbeným a využívaným modelem při vytváření experimentální míšní léze. SCI je indukováno mechanicky. Od kontuzního modelu se liší tím, že je na míchu mechanicky působeno delší dobu, jinak řečeno stlačení míchy trvá určitý čas. Tento mechanismus je velmi podobný, jako při poranění míchy u lidí. U pacientů velmi často dochází k přetrvávajícímu stlačení míchy, tím dochází k vyvolání sekundárních procesů, které přímo určují charakter dané léze (Zhang et al., 2013). Samotná léze se rozvíjí na základě právě těchto sekundárních procesů. Kompresní model je tedy v tomto ohledu relevantnější, protože napodobuje skutečný klinický stav u pacientů po SCI. Mezi běžně využívané kompresní modely patří model svorkový a balónkový.

Svorkový model byl poprvé použit v roce 1978, kdy míšní poranění bylo indukováno pomocí aneurysmální svorky (viz obrázek č. 7A) u potkanů (Rivlin & Tator, 1978). Model spočívá v provedení kompletní laminektomie, aby došlo k odhalení míchy na požadovaném místě a následném nasazení svorky na míchu na přesně definovanou dobu, což vyvolá akutní SCI (viz obrázek č. 7B). To, jaký charakter a jak vážné poranění bude, potom určuje použitá síla, jakou svorka na míchu působí, doba trvání působení i tvar svorky (Poon et al., 2007).

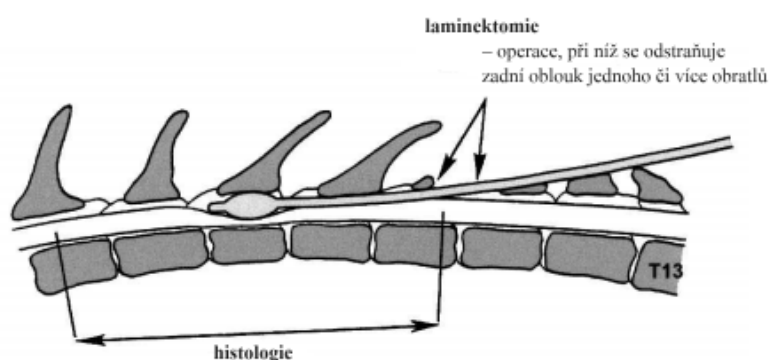


Obrázek 7. (A) Ukazuje fotografii aneurysmální svorky, která se využívá pro vytvoření svorkového modelu SCI (převzato a upraveno z Cheriyan et al., 2014 dle Poon et al., 2007). (B) Schématický diagram kalibrované komprese. Po laminektomii se nastaví šířka svorky pomocí spaceru, tak aby se mícha v požadovaném místě do svorky přesně vešla. Vybere se doba komprese míchy. Šířku a dobu trvání stlačení míchy lze upravit tak, aby způsobila požadovanou závažnost poranění (převzato a upraveno z Cheriyan et al., 2014).

Balónkový model byl poprvé proveden v roce 1953 na psech (Tarlov et al., 1953). Tento model je vytvářen pomocí malého katétru, který má na svém konci umístěný balónek (viz obrázek č. 8C). Katétr je vložen do epidurálního nebo subdurálního prostoru, kde je balónek nafouknutý naplněním buď vzduchem nebo fyziologickým roztokem (viz obrázek č. 8D). Před zasunutím katétru do epidurálního prostoru je nutné provést laminektomii (viz obrázek č. 9). Objem, na jaký je balónek nafouknutý, určuje, jak moc bude mícha stlačena (Vanický et al., 2001). Celý proces komprese trvá určitou dobu, která opět ovlivní charakter celého zranění. Zranění vyvolaná prostřednictvím balónku pak můžeme rozdělit podle objemu, na jaký byl balónek nafouknutý, podle doby, jakou bylo na míchu působeno nebo podle obou faktorů dohromady.



Obrázek 8. (C) Ukázka katétru s na konci umístěným balónkem, který se dá použít pro vytvoření balónkového modelu SCI (převzato z Cheriyan et al., 2014). (D) Fotografie zobrazující velikost obratle T9 a porovnání s velikostí nafouklých balónků na 10, 15 a 20 μ l (zprava doleva) fyziologickým roztokem (měřítko na pravé straně je v centimetrech) (převzato a upraveno dle Vanický et al., 2001).



Obrázek 9. Schéma ukazující místo laminektomie, polohu katétru a velikost segmentu odříznutého pro histologické zpracování – zákrok byl proveden z dorsální strany (převzato a upraveno z Vanický et al., 2001).

5. Cíle práce

1. Vytvoření experimentálního modelu míšního poranění, který bude klinicky relevantnější a co možná nejblíží skutečnému poranění u lidí z pohledu patologie, úrovně SCI a komplexity celého poranění.
2. Zhodnocení funkčního dopadu experimentálního ventrálního modelu míšního poranění pomocí behaviorálního testování.
3. Sledování změn míchy na histologické úrovni – úbytek šedé a bílé hmoty, počet motoneuronů a velikost gliové jizvy.

6. Materiál a metody

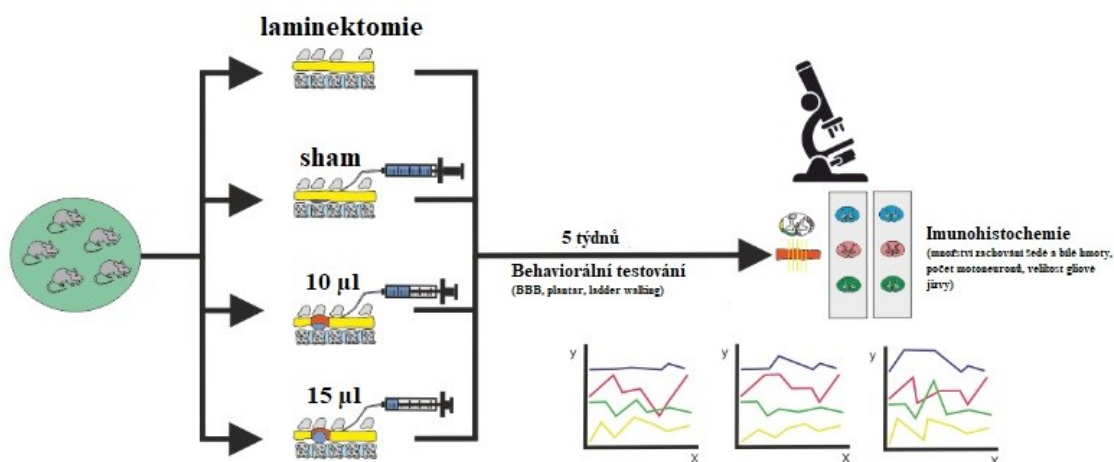
6.1 Experimentální zvířata

Pro experimentální model ventrální míšní léze byli použiti potkaní samci kmene Wistar (kmen RjHan: WI). Samci byli vybráni kvůli absenci estrálního cyklu. Kmen Wistar byl vyšlechtěn Donaldsonem již v roce 1906 ve Wistar Institute (USA), ze skupiny potkanů, která původně patřila univerzitě v Chicagu (Clause, 1993) a jedná se o kmen albínů.

Potkan kmene Wistar je jedním z nejvyužívanějších ve všech oblastech lékařského a biologického výzkumu. Je poměrně dlouhověký a učenlivý, proto je vhodný pro velké spektrum experimentů (od výzkumů spojených s mechanismy stárnutí a karcinogenezí až po modely lézí a poranění) (Clause, 1993).

Pro tento výzkum byli použiti samci potkanů kmene Wistar ve věku 10 týdnů, kteří byli získáni z chovného zařízení Fyziologického ústavu Akademie věd ČR v Praze. V době zahájení celého experimentu se jejich váha pohybovala okolo $300 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$. Potkani byli chováni v klecích po dvou ve zvěřincích se stálým režimem (12 hodin světla a 12 hodin tmy), teplotou (mezi 22 až 24 °C) a stabilní vlhkostí. Přístup k potravě a vodě byl *ad libitum*. Počet jedinců v jednotlivých skupinách byl stanoven předem na základě statistické analýzy s cílem redukovat tento počet na minimum.

Po vytvoření SCI byli potkani náhodně rozděleni do 4 skupin. Každá skupina prošla jedním před-testovacím týdnem, operativním zákrokem, jedním týdnem, kdy si potkani zvykali na následky operativního zákroku a pětítýdenním testováním. Šestý týden po operaci byli usmrceni, naperfundováni a jejich míšní tkáň byla použita pro histologickou a imunohistochemickou analýzu (viz obrázek č. 10).



Obrázek 10. Grafické schéma znázorňující průběh pokusu. Nejdříve proběhl předtestovací týden, během kterého se zvířata seznámila se samotnými behaviorálními testy. Během dalšího týdne proběhla operace. Týden po operaci zvířata testována nebyla z důvodu rekonvalescence organismu. Následovalo 5 týdnů testování. Každý týden byla testována motorika BBB testem a hyperalgie pomocí plantar testu. V posledním týdnu po operaci byla zvířata otestována i pomocí dalšího motorického testu – ladder walking. Po skončení behaviorálního testování byla zvířata usmrcena a mícha byla zafixována prostřednictvím transkardiální perfúze a paraformaldehydu. Poté přišla na řadu příprava tkáně na imunohistochemické a histologické barvení a analýzu řezů.

U 11 jedinců z 1. skupiny byla provedena léze naplněním balóнку destilovanou vodou na 10 µl, u 13 jedinců z 2. skupiny byl balónek naplněn na 15 µl. Ve 3. a 4. skupině bylo 5 jedinců a sloužily jako kontrolní. Nebyla u nich provedená léze jako taková. Ve 3. skupině byl jedincům pouze vsunut katétr s balóńkem, ale balónek nebyl nafouknutý a ve 4. skupině byla jedincům pouze provedena laminektomie, tedy odstranění oblouku desátého hrudního obratle ve stejném místě, kde byl vsunut katétr s balóńkem u skupin 1, 2 a 3. Tabulka č. 1 shrnuje číselné označení jednotlivých skupin, počet experimentálních zvířat v daných skupinách a uvádí provedený operativní zákrok.

Veškeré experimenty byly vykonány v souladu se Směrnicí Evropského parlamentu a Rady vlády z 22. září 2010 (2010/63/EU) o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely a byly schváleny etickou komisí Ústavu experimentální medicíny Akademie věd ČR v Praze.

Číslo skupiny	Počet potkanů	Operativní zákrok
1	11	10 μ l
2	13	15 μ l
3	5	Zasunutí katétru bez nafouknutí balónku na jeho konci – <i>sham</i>
4	5	Laminektomie

Tabulka 1 Shrnující tabulka: Přehled testovaných skupin, počtu zvířat v jednotlivých skupinách a zákroků.

6.2 Poranění míchy z ventrální strany

Na pokus bylo vzato 35 potkaních samců kmene Wistar. Jako anestetikum, během celého zákroku, byl použit isofluran (2,5 % - 3,0 % koncentrace), který snižuje práh bolestivosti a relaxuje svaly. Přesný mechanismus jeho účinku není znám, ale pravděpodobně dochází k vazbě na GABA (*gamma-aminobutyric acid*, kyselina gamma-aminomáselná), glutamátové a glycinové receptory. Jeho vazba na receptor vyvolává odlišné odpovědi v závislosti na typu receptoru. V případě GABA_A receptoru funguje jako pozitivní alosterický modulátor (Jones et al., 1992). Vazbou na glycinové receptory snižuje jejich motorickou funkci (Grasshoff & Antkowiak, 2006) a zároveň inhibuje řízení kanálů pro K⁺ (Buljubasic et al., 1992). Isofluran také ovlivňuje další intracelulární molekuly a tím ovlivňuje biochemické procesy probíhající v buňce (shrnutí v Eger, 1981).

Proti bolesti byl potkanům intraperitoneálně podán buprenorfin (chemicky (2S)-2-[17(cyklopropylmethyl)-4,5a-epoxy-3-hydroxy-6-methoxy-6a,14-ethano-14a-morfinan-7a-yl]-3,3-dimethylbutan-2-ol). Jde o semi-syntetický opioid, látku odvozenou od thebainu, jednoho z chemicky neaktivnějších morfinových alkaloidů, který je součástí opia (Bentley et al., 1967). Buprenorfin je agonistou μ -receptorů (OP3) a δ -receptorů (OP1), antagonistou κ -receptorů (OP2). K δ -receptorům má nejnižší afinitu. Dobře proniká tkáněmi, protože je vysoce rozpustný v tucích (projde snadno přes buněčnou membránu), ale i ve vodě, má nízkou molekulovou hmotnost a jeho samotná konfigurace průnik do tkání usnadňuje. Buprenorfin je přibližně 25–50x silnější než (hmotnostně) srovnatelná dávka morfinu a analgezie po buprenorfinu trvá déle (Lewis, 1985).

Pro samotný zákrok byl použit Fogartyho katétr (Fogarty Arterial Embolectomy Catheter, Edwards Lifesciences, model 120602F), který má na svém konci umístěný balónek, který lze nafouknout. V humánní medicíně se tento katétr používá při zákroku zvaném embolektomie, což je nejefektivnější místní zákrok při ucpání cév. Katétr byl pro účely tohoto

zákroku zkrácen, kvůli lepší kontrole, zda v něm náhodou není vzduchová bublina. Katétr byl připevněn k injekční stříkačce Hamilton (typ 1705 TLLX 50 μ l), která byla vložena do mikromanipulátoru, který umožnil nafouknutí balónku na přesný objem (viz obrázek č. 11). Injekční stříkačka Hamilton i samotný balónkový katétr byl naplněn destilovanou vodou. Ve vzdálenosti 1 cm od středu balónku byla vytvořena značka (viz obrázek č. 12), která určovala, jak daleko můžeme katétr zasunout do epidurálního prostoru, aby došlo k lézi na požadované úrovni Th8.



Obrázek 11. Mikromanipulátor, do kterého byla umístěna injekční stříkačka Hamilton 50 μ l. Na fotografii je vidět stupnice, díky které je možné nafouknout balónek na konci katétru přesně na požadovanou hodnotu.



Obrázek 12. Katétr s nenafouknutým balónkem a vyznačenou značkou, po kterou byl katétr zasunut do epidurálního prostoru. Fotografie pořízená operačním mikroskopem značky ZEISS.

Po úvodní anestézii byla potkanům nasazena maska napojená na vaporizér s isofluranem. Potkanům byly oholeny chlupy na zádech v rozsahu očekávané operační rány (viz obrázek č. 13). Poté byla kůže nastřížena (viz obrázek č. 14). Vrstvy zádočných svalů byly odhrnuty pomocí rozvěrače, aby byla přístupná páteř. Výběžky obratlů v oblasti Th10 a Th11 byly odstraněny, potom byl za pomoci kostních kleští – *bone ronger* – odstraněn oblouk desátého hrudního obratle, a tím byla odhalena mícha (viz obrázek č. 15). Do subdurálního prostoru míchy byl vsunut katétr až po značku, která byla vytvořena 1 cm od středu balónku (viz obrázek č. 16). Jelikož se jedná o model ventrální léze tak byl balónek podsunut pod míchu do oblasti *fissura mediana anterior* (viz obrázek č. 17). V této části byl balónek pomocí mikromanipulátoru nafouknut a stlačení tkáně trvalo přesně 5 minut. Poté byl balónek

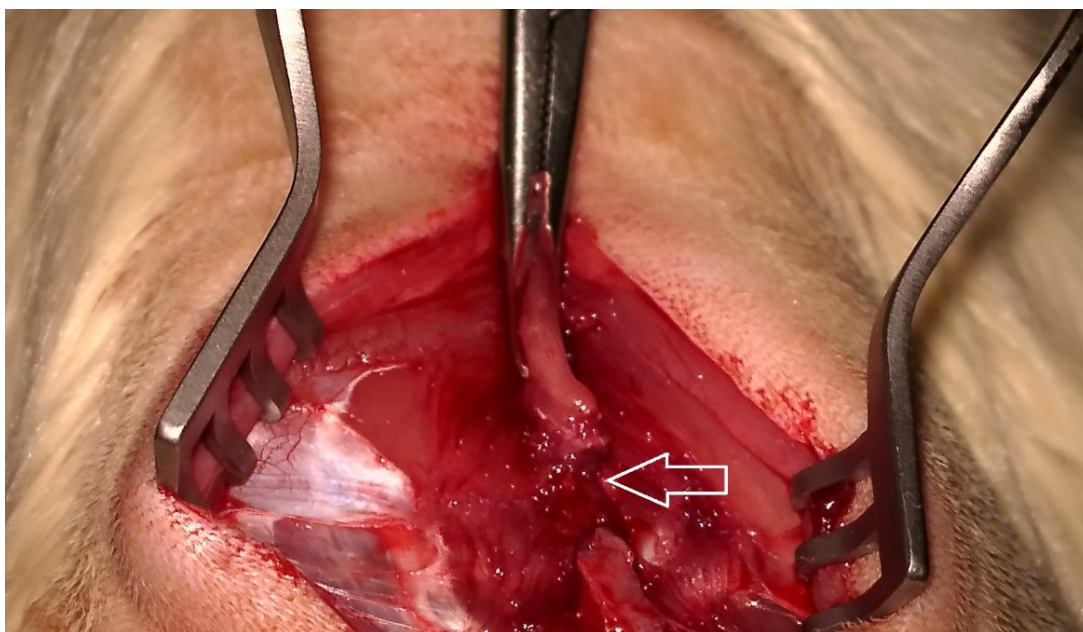
vyfouknut a katétr vytažen. Tímto způsobem byla vytvořena léze v míšní oblasti Th8. Odhalená mícha potom byla překryta vnitřní vrstvou svalů pomocí stehu, který zároveň sloužil jako značka při vyjímání míchy po transkardiální perfúzi (viz obrázek č. 18). Celá rána potom byla sešitá v anatomických vrstvách po celé délce pomocí chirurgického šití. Stehy byly přetřené Novikovým roztokem (obvykle označovaný jako *solutio Novikov*) (viz obrázek č. 19). Jde o roztok elastického kolodia a brilantové zeleně ve směsi ethanolu s etherem. Slouží jako tekutý obvaz s antiseptickými účinky pro ošetření drobných poranění a zejména v lékařství po chirurgickém sešití ran (Kramer & Behrens–Baumann, 2002).



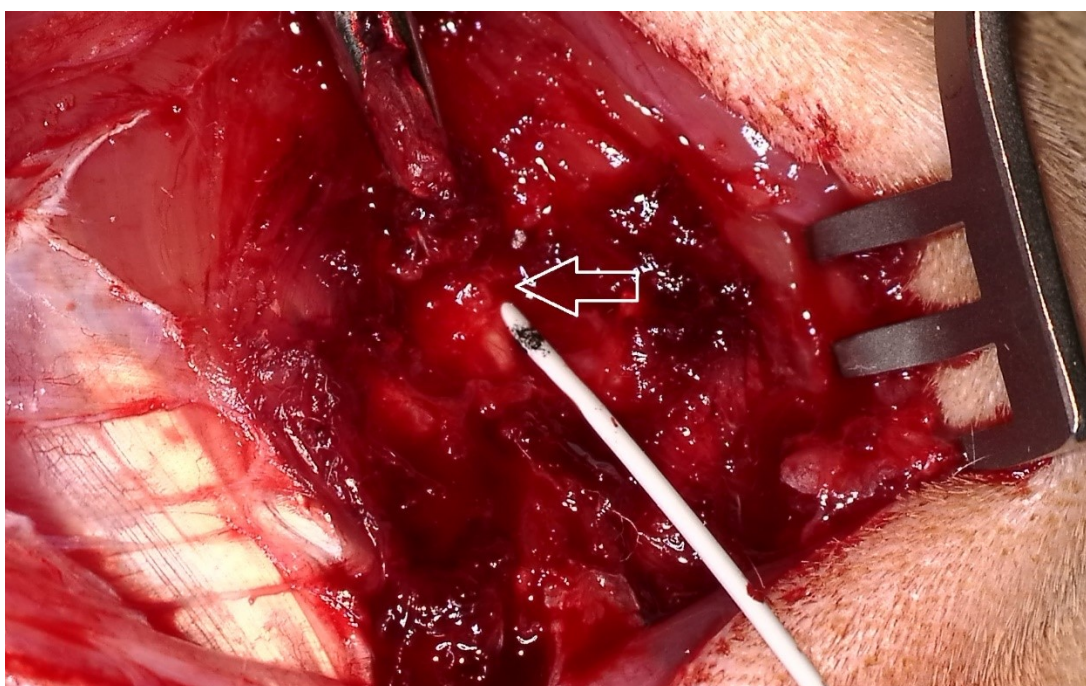
Obrázek 13. Fotografie potkana s vyholenými zády, dýchací maskou na čumáku a ukázkou některých chirurgických nástrojů použitých při operaci.



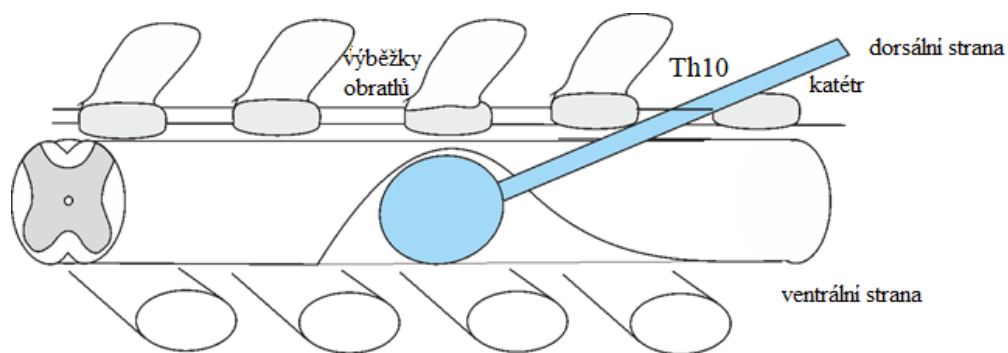
Obrázek 14. Detailnější pohled na rozstřiženou kůži na začátku zákroku.



Obrázek 15. Fotografie pořízená operačním mikroskopem od firmy ZEISS. Fotografie ukazuje detail na odstraněný trn obratle Th10 – označené šipkou



Obrázek 16. Fotografie pořízená operačním mikroskopem od firmy ZEISS. Fotografie ukazuje detail na odhalenou míchu a katétr (označené šipkou), který je již až po značku zasunutý do epidurálního prostoru, jelikož jde o ventrální lézi, tak se katétr vsunuje ze strany a zespoda.



Obrázek 17. Schéma ukazující zasunutí balónku tak, aby výsledkem byla ventrální léze.



Obrázek 18. Fotografie ukazuje detail na zakrytí míchy sešitím vnitřní vrstvy zádoových svalů.



Obrázek 19. Fotografie ukazuje konec operace, kdy je rána zašitá a stehy jsou pokryté Novikovým roztokem.

6.3 Behaviorální testování

Pro funkční testování byla vybrána sada třech behaviorálních testů. Týden před indukcí míšní léze prošli potkani stejnou sadou behaviorálních testů, aby si zvykli na testovací podmínky a byli schopni vykonávat danou úlohu bez zbytečného stresu a současně tím došlo ke snížení pravděpodobnosti vzniku potencionálních chyb. Testy byly prováděny po dobu 5 týdnů od SCI vždy ve stejné dny (i časy) v průběhu týdne.

6.3.1 BBB test

Pro hodnocení lokomočních funkcí byl zvolen BBB test. Jeho název je odvozen od prvních písmen z příjmení jeho tvůrců Basso, Beatie a Bresnahan a jde o jeden z nejpoužívanějších testů motorických funkcí u potkanů po SCI.

Test je založen na sledování pohybových schopností zvířete v otevřené aréně (*open field test*) po dobu přibližně 4 minut (viz obrázek č. 20A). Po pozorování zvířete, které se po určitou dobu volně pohybovalo v aréně, byla každá z jeho zadních končetin ohodnocena v rámci bodové škály 0 – 21. Basso, Beatie a Bresnahan (1995) vytvořili škálu na základě hybnosti kloubů zadních končetin, umístění tlapek vůči povrchu arény, vzájemné koordinace předních a zadních končetin, podpory váhy těla, polohy ocasu během chůze a dalších parametrů.

Samotné testování se dá rozdělit do třech kategorií. První kategorie zahrnuje sledování pohybu v jednotlivých kloubech zadních končetin až po takzvané „zametání“ (*sweeping*) bez zapojení váhy těla (skóre 0 – 8). *Sweeping* je definován jako pohyblivost všech třech kloubů v plném rozsahu bez podpory váhy těla. Druhá kategorie už slouží k analýze provedení samotných kroků, kdy zvíře zapojuje vlastní váhu, plantární umístění tlapek, předozadní koordinaci končetin, postavení a vnitřní/vnější rotaci tlapek během pokládání či zvedání zadní končetiny (skóre 9 – 14). Poslední část hodnotí takzvaný *toe clearance* – zvuk, který zvíře vydává pomocí palce zadní tlapky při protažení špičky během kroku; zvedání ocasu během pohybu a stabilitu trupu (Basso et al., 1995).

Zvířata byla testována 1x týdně po dobu 5 týdnů. Pro zpřesnění výsledků, byla zvířata hodnocena i půl body. Pokud zvíře svou chůzí splňovalo nějaký z parametrů následujícího bodu z hodnotící škály, byl mu na danou tlapku přidán půl bod, aby bylo následné vyhodnocování, co možná nejpresnější.

6.3.1.1 Škála BBB testu dle Basso, Beatie a Bresnahan (1995)

0 - Nelze pozorovat pohyb zadních končetin, zvíře za sebou zadní končetiny bezvládně „tahá“ (viz obrázek č. 20 C, D).

1 - Je patrný¹ mírný (velmi omezený) pohyb jednoho nebo dvou kloubů, obvykle kyčle a/nebo kolene.

2 - Objevuje se² extenzivní pohyb jednoho kloubu nebo extenzivní pohyb jednoho kloubu a mírný pohyb kloubu druhého.

3 - Dá se pozorovat extenzivní pohyb dvou kloubů.

4 - Dá se pozorovat mírný pohyb všech třech kloubů zadní končetiny.

5 - Zvíře mírně pohybuje dvěma klouby a je schopno extenzivního pohybu kloubu třetího.

6 - Dá se pozorovat extenzivní pohyb dvou kloubů a omezená (mírná) pohyblivost u kloubu třetího.

7 - Projevuje se jako extenzivní pohyb všech třech kloubů zadní končetiny.

8 - Charakteristické je „zametání“ (*sweeping*) nebo plantární flexe bez zátěže (zvíře do pohybu nezapojuje váhu vlastního těla).

9 - Stoj je podpořen váhou vlastního těla nebo se dají pozorovat kroky s patrným zapojením vlastní váhy (váhou mohou být podpořeny jen některé kroky anebo už všechny).

10 - Při chůzi je patrné³ občasné zapojení váhy vlastního těla, ale pohyb zadních a předních končetin není koordinovaný.

11 - Při chůzi je patrné⁴ časté až ⁵konstantní zapojení váhy vlastního těla, ale pohyb zadních a předních končetin není koordinovaný.

12 - Při chůzi je patrné časté až konstantní zapojení váhy vlastního těla, začíná se objevovat i občasná koordinace zadních a předních končetin.

13 - Při chůzi je patrné časté až konstantní zapojení váhy vlastního těla, začíná se objevovat i častá koordinace zadních a předních končetin.

14 - Při chůzi jsou jednotlivé kroky podpořeny váhou vlastního těla, pohyb předních a zadních končetin je koordinovaný, ale při prvním kontaktu se zemí zvíře pokládá tlapku

vtočenou/vytočenou vůči tělní ose anebo se objevuje vnitřní/vnější rotace tlapek při zvedání končetiny.

15 - Při chůzi jsou jednotlivé kroky podpořeny váhou vlastního těla, pohyb předních a zadních končetin je koordinovaný, zvíře pokládá tlapku vůči vlastnímu tělu paralelně při každém novém kroku, při krocích se může objevit zvuk vydaný palcem zadních tlapek během pohybu (*toe clearance*).

16 - Při chůzi jsou jednotlivé kroky podpořeny váhou vlastního těla, pohyb předních a zadních končetin je koordinovaný během chůze, *toe clearance* se může objevit během kroku směrem dopředu, při iniciaci kroku je tlapka rovnoběžná s osou těla zvířete a k rotaci dochází až při zvedání tlapy.

17 - Při chůzi jsou jednotlivé kroky podpořeny váhou vlastního těla, pohyb předních a zadních končetin je koordinovaný během chůze, *toe clearance* se objevuje často během kroku směrem dopředu, při iniciaci kroku i při zvedání tlapy po ukončení kroku je tlapka rovnoběžná s osou těla zvířete.

18 - Při chůzi jsou jednotlivé kroky podpořeny váhou vlastního těla, pohyb předních a zadních končetin je koordinovaný během chůze, *toe clearance* je konstantní během kroku směrem dopředu, při iniciaci kroku je tlapka rovnoběžná s osou těla zvířete a k rotaci dochází během zvedání tlapy.

19 - Při chůzi jsou jednotlivé kroky podpořeny váhou vlastního těla, pohyb předních a zadních končetin je koordinovaný během chůze, *toe clearance* je konstantní během kroku dopředu, při iniciaci kroku i při zvedání tlapy od povrchu arény je tlapka rovnoběžná s osou těla zvířete, ocas zvířete je většinu času nebo pořád orientován dolů.

20 - Při chůzi jsou jednotlivé kroky podpořeny váhou vlastního těla, pohyb předních a zadních končetin je koordinovaný během chůze, *toe clearance* je konstantní během kroku dopředu, při iniciaci kroku i při zvedání tlapy je tlapka rovnoběžná s osou těla zvířete, ocas zvířete je konstantně orientován nahoru, patrná ⁶nestabilita trupu.

21 - Konstantní kroky podpořeny váhou vlastního těla, koordinovaná chůze, konstantní *toe clearance*, paralelní pozice tlapek vůči ose těla během stoje, pohyb trupu je stabilní a ocas míří směrem vzhůru. (21 bodů by měl dosáhnout každý zdravý/kontrolní potkan bez míšního poranění či jiného motorického problému) (viz obrázek č. 20 B).

Pozn.

Basso, Beatie a Bresnahan (1995) definovali jednotlivé typy pohybu (popsaných v hodnotící škále) stejně jako ostatní pojmy, které by u různých experimentátorů mohli být odlišné, aby test nebyl pouze subjektivním výstupem pozorovatele, ale stal se objektivnějším a replikovatelnějším napříč nejrozličnějšími projekty.

¹Mírný pohyb – pouze částečný pohyb v kloubu; kloub se nepohybuje ani v ½ svého maximálního rozsahu

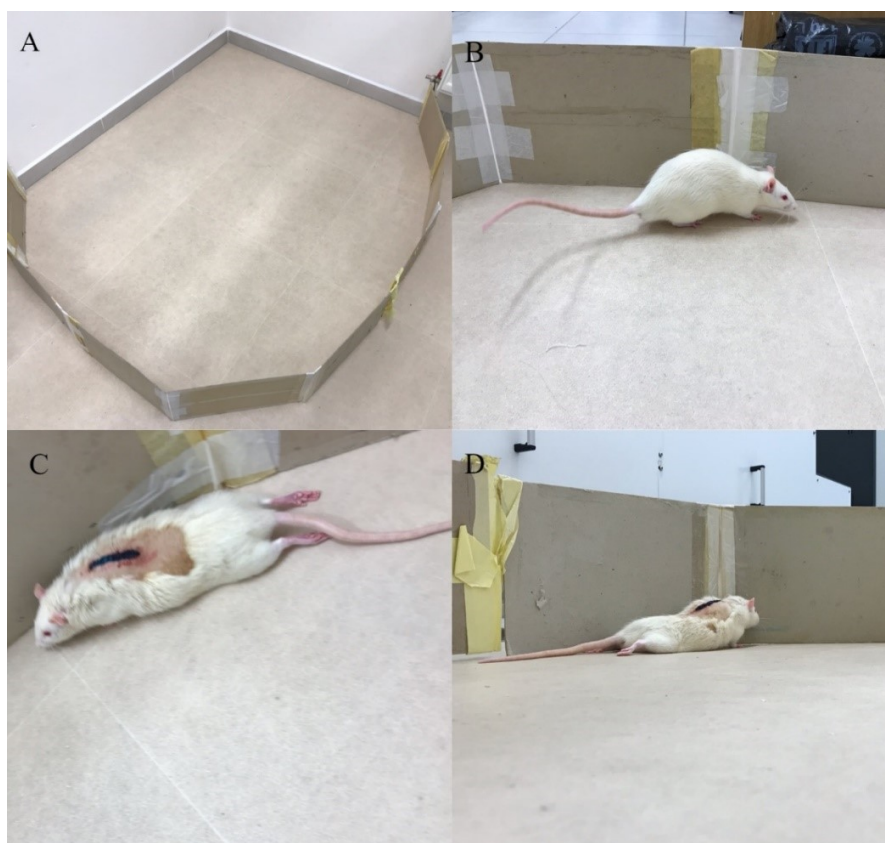
²Extenzivní pohyb – rozsáhlejší pohyb v kloubu; pohyb kloubu využívá minimálně ½ maximálního rozsahu kloubu

³Občasné – méně nebo rovno 50 %

⁴Frekventované (časté) – víc jak 50 %, ale ne vždycky (51 % – 94 %)

⁵Konstantní (stálé) – skoro neustále nebo neustále (95 % – 100 %)

⁶Nestabilita trupu – kolébání se ze strany na stranu – částečná kompenzace pohybu zapojením hmotnosti těla



Obrázek 20. (A) Představuje otevřenou arénu, ve které byl po 4 minuty sledován, a následně hodnocen, volný pohyb zvířete. (B) Ukazuje zdravého potkana, který by v hodnotící škále dosáhl skóre 21 na levou i pravou zadní tlapku – splňuje veškerá kritéria, včetně zdvihnutého ocasu a stabilního trupu. (C, D) Reprezentuje zvíře po zákroku, na zádech zvířete je vidět dezinfikovaná a zašitá rána. Tento potkan po SCI by na škále BBB testu (dle statické fotografie) mohl získat jen 0–8 bodů na levou i pravou tlapku. Z fotografie je patrné, že plantární flexe není možná, neboť plošky obou tlapek směřují ke stropu, sledoval by se tedy pouze rozsah pohybu v jednotlivých kloubech, výpovědnější by v tomto případě bylo dynamické video, na kterém by bylo vidět, že tento jedinec není schopen pohybu ani v jednom z kloubů zadních končetin.

6.3.2 Plantar test

Jako senzorický test, sloužící k detekci poruchy senzorického čítí, zejména hyperalgie (zvýšená citlivost na bolest) u potkanů po SCI, byl zvolen Plantar test (*Hargreavesova metoda, Hot Plate test*). Plantar test byl sestaven tak, aby umožnil kvantifikaci periferně zprostředkované odpovědi na tepelnou stimulaci. Tento test byl popsán už v roce 1988 jako Hargreavesova metoda (Hargreaves et al., 1988), která měla být citlivější a více vypovídající než do té doby používaný Randall – Sellitův test založený na mechanickém (tlakovém) stimulu, který způsobuje bolest u pokusných zvířat (Randall & Sellito, 1957).

Celý test byl prováděn v zařízení od italské firmy Ugo Basile, které se skládá z podstavce, pod kterým je umístěna pohyblivá infračervená lampa (generátor tepelného stimulu) (viz obrázek č. 21). Na podstavec se umísťují akrylové boxy pro zvířata a teplovodivá skleněná deska (viz obrázek č. 22). Potkan byl umístěn do boxu a po krátké adaptační periodě trvající několik málo minut, kdy potkan spontánně a aktivně prozkoumával prostředí boxu (přirozené explorační chování potkana), začalo samotné měření. Paprsek lampy byl zacílen na chodidlo zadní končetiny, přibližně do středu plantární části tlapky (viz obrázek č. 23). Pro co nejpresnější výsledky, byl paprsek lampy cílen na stále stejné místo na zadních tlapkách. Po zacílení byla experimentátorem spuštěna infračervená lampa, která zahřívala tlapku potkana. Měření času je ukončeno přístrojem automaticky potom, co dojde k odtažení končetiny od tepelného zdroje. Test (viz obrázek č. 25) spočívá tedy v tom, že je zadní končetina potkana vystavena tepelnému podráždění, dokud potkan nevnímá bolest a stojí stále na stejném místě, tak je automaticky zaznamenáván čas počítačem (viz obrázek č. 24) propojeným s generátorem infračerveného tepla. Pokud potkan začne cítit bolest, tak díky nepodmíněným reflexům končetinu odtáhne, v ten moment přístroj čas měřit přestává.

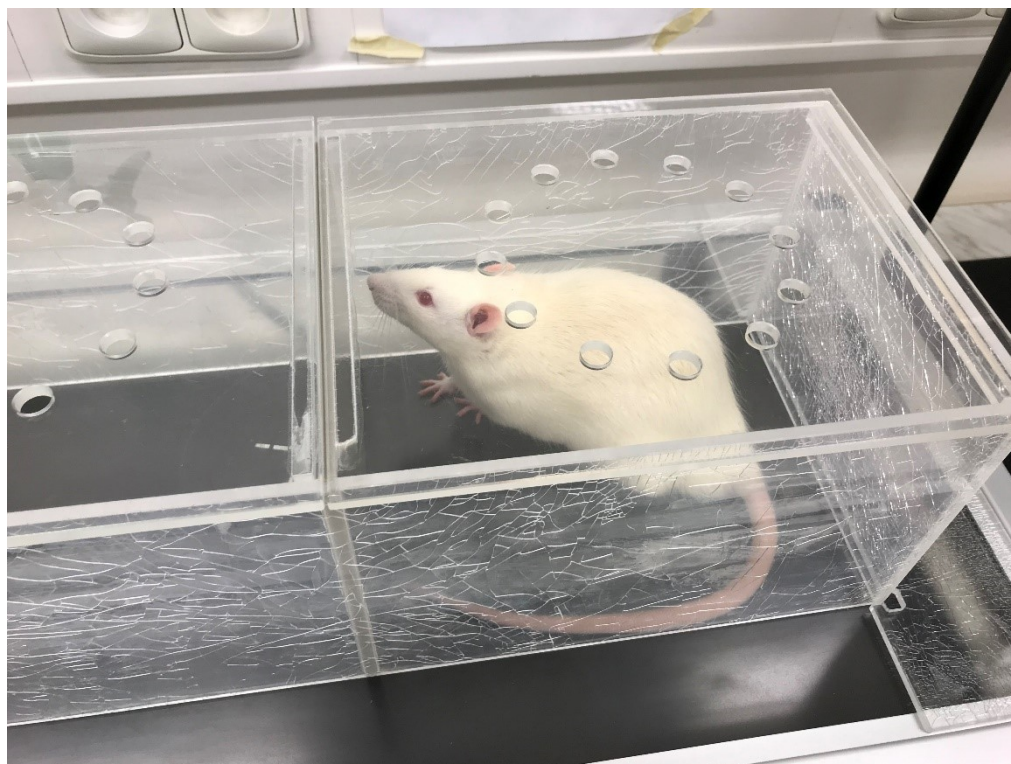
Obě zadní končetiny byly takto změřeny pětkrát, mezi jednotlivými měřeními na stejných tlapkách byla vždy prodleva minimálně 2 minuty, aby nedošlo k popálení tlapek potkana, výsledek ze všech 5 měření byl poté zprůměrován. Tento test byl prováděn jednou týdně po dobu 5 týdnů.

Během měření bylo hlídáno několik faktorů – pokud došlo k mikci či kálení zvířete, musel být akrylový podstavec očištěn ještě před zahájením dalšího měření, jinak by došlo ke zkreslení výsledků, protože fyzikální vlastnosti (tepelná vodivost) moči jsou jiné než suché teplovodivé skleněné desky, pod kterou je umístěn tepelný zdroj. Dále bylo nutné sledovat chování samotného zvířete, ne vždy potkan odtáhl tlapku právě kvůli tomu, že bylo tepelné

podráždění až příliš velké, často docházelo k tomu, že potkan pouze změnil polohu tlapky (například kvůli přešlápnutí) a přístroj tak přestal zaznamenávat čas.



Obrázek 21. Pohyblivá infračervená lampa – generátor tepelných stimulů.



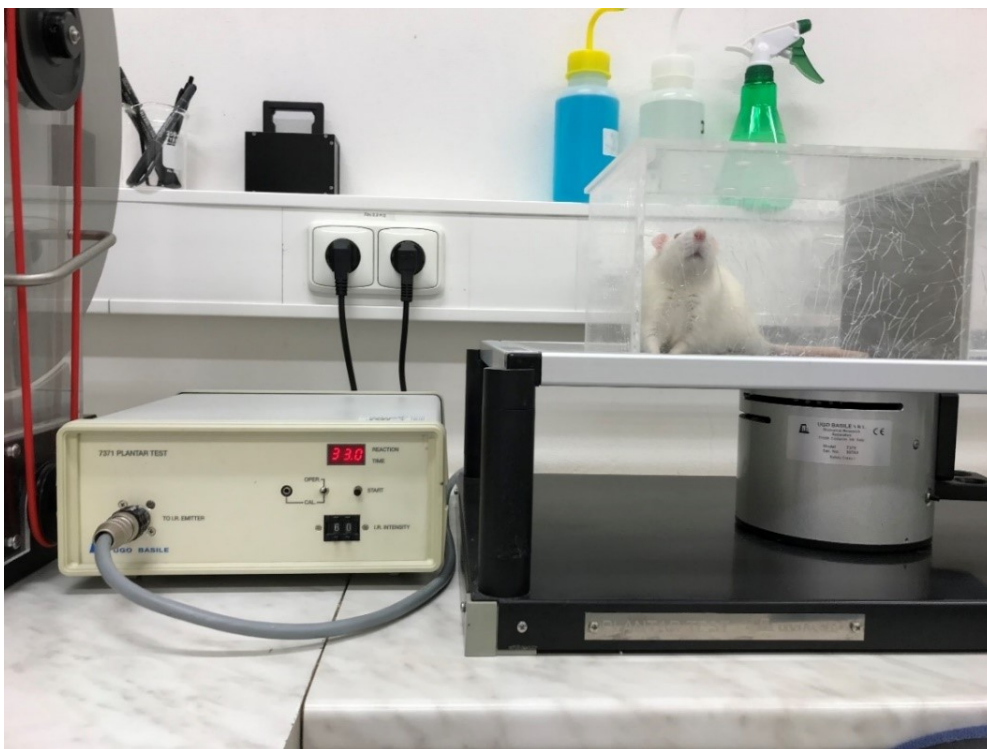
Obrázek 22. Akrylový box, do kterého byli umisťováni potkani během testování.



Obrázek 23. Detail tlapky a pohyblivé lampy během testování. Infráčervená lampa jako zdroj tepelného podráždění byla umístěna při každém měření do stejných míst na zadních tlapkách (měřená tlapka je označena šipkou), aby naměřené hodnoty měly správnou výpovědní hodnotu a výsledky byly co možná nejpřesnější. Pokud by se poloha lampy v rámci zadní končetiny výrazně měnila, výsledky by tak přesné nebyly především kvůli rozdílné citlivosti vnímání tepla a bolesti.



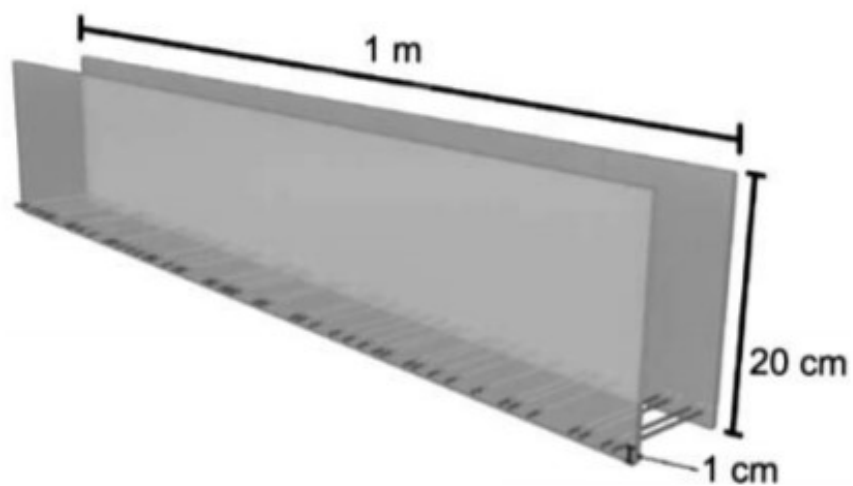
Obrázek 24. Počítač zaznamenávající čas, jak dlouho potkan vydržel tepelnou stimulaci, než podnět začal vnímat jako bolest.



Obrázek 25. Obrázek ukazuje celkový pohled na Plantar test. Na podstavci jsou umístěné akrylové boxy, do kterých byli dáni testovaní potkani. Pod samotným podstavcem je pohyblivá infračervená lampa, která slouží jako tepelný zdroj. Na levé straně obrázku je vidět počítač, který zaznamenává čas, po který potkan tepelnou stimulaci je schopný vydržet.

6.3.3 Ladder walking

Jako další motorický test této práce byl zvolen *ladder walking*. Tento test byl vybrán především kvůli jeho citlivosti pro odhalení i pouze drobných a mírných problémů s motorickými funkcemi. Celý test spočívá v tom, že potkan má přejít po vodorovném žebříku z jednoho konce na ten druhý. Během toho je sledován počet chybných kroků. Aparatura (viz obrázek č. 26, 27) se skládá z bočních, průhledných stěn (plexisklo) a z kovových příček (viz obrázek č. 28) s plošinkou na každé straně. Rozestup mezi jednotlivými příčkami je variabilní a periodicky se mění, tím pádem se potkan nemůže naučit relativní ani absolutní polohu jednotlivých příček mezi sebou. Tím se minimalizuje schopnost potkana kompenzovat poruchy motoriky skrz učení (Metz & Whishaw, 2002; Metz & Whishaw, 2009). Z obou stran jsou na aparaturu připevněna zrcadla (viz obrázek č. 29), díky kterým jde pozorovat provedení samotného kroku ze všech stran. Součástí aparatury je i kamera (viz obrázek č. 30) pohybující se po kolejnicích. Pohyb kamery sleduje pohyb potkana, posouvá se s ním a jeho pohyb zaznamenává (viz obrázek č. 31).



Obrázek 26. Schématicky naznačená aparatura ladder walking testu (převzato z Metz & Whishaw, 2009)



Obrázek 27. Fotografie aparatury, ve které byli potkani testováni.



Obrázek 28. Fotografie nepravidelně rozmístěných kovových příček, po kterých potkan chodí.



Obrázek 29. Fotografie ukazuje postranní zrcadla, díky kterým lze sledovat potkana ze všech stran.



Obrázek 30. Kamera zaznamenávající pohyb potkana a kolejnice, po které se kamera pohybuje



Obrázek 31. Pohled na aparaturu zepředu, včetně počítače, se kterým je celá aparatura propojena a do kterého se ukládá záznam z videokamery.

Úkolem potkanů bylo tedy přejít z jedné strany aparatury na druhou, kde byl umístěný domeček. Domeček pro potkany představoval místo úkrytu a bezpečí. Všichni potkani šli stejným směrem. Na rozdíl od ostatních behaviorálních testů se tento test prováděl pouze týden před samotnou operací, v rámci předtestování, a poté až v posledním týdnu testování. Nahrané záznamy byly následně analyzovány a vyhodnocovány.

V rámci kvantitativního hodnocení byla určena frekvence chybných kroků. Frekvence je počítána jako rozdíl celkového počtu kroků k počtu uklouznutí. Test může být hodnocen i kvalitativně za pomoci chybového skórovacího systému (*fault scoring system*) zavedeného Metzem a Whishawem (Metz & Whishaw, 2002; Metz & Whishaw, 2009), kde se hodnotí to, jak potkan umísťuje přední a zadní tlapky na jednotlivé příčky během chůze. Hodnocení se pohybuje na 7 bodové škále, podle toho, jak byla tlapka na příčku umístěna a jaká byla přesnost kroku.

6.3.3.1 Skórovací systém (Metz & Whishaw, 2002)

0 - Total miss. 0 bodů bylo uděleno, pokud potkan tlapkou příčku zcela vynechal, tj. tlapkou na příčku vůbec nešlápl, a proto došlo k pádu. Jak potkan minul příčku, tak se zadní nohou propadl do prázdna, byla narušena rovnováha i držení těla (viz obrázek č. 32).

1 - Deep slip. Potkan sice šlápl na příčku, ale při přenášení váhy během kroku končetina z příčky sklouzla, což způsobilo pád.

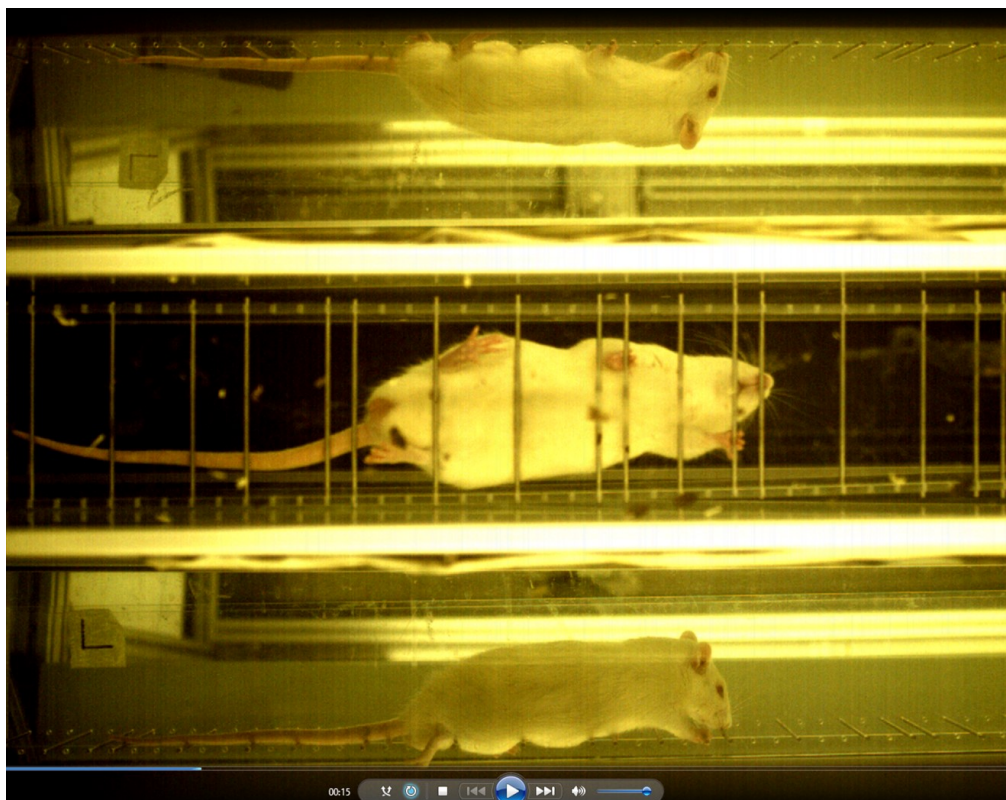
2 - Slight slip. Potkan šlápl na příčku, při přenášení váhy na končetinu mu tlapka sklouzla, ale nevedlo to k pádu a ani k přerušení chůze. Potkan vyrovnal rovnováhu a pokračoval v chůzi (viz obrázek č. 33).

3 - Replacement. Potkan šlápl na příčku, ale dříve, než přenesl váhu těla, tak tlapku zase zvedl a položil ji na další příčku.

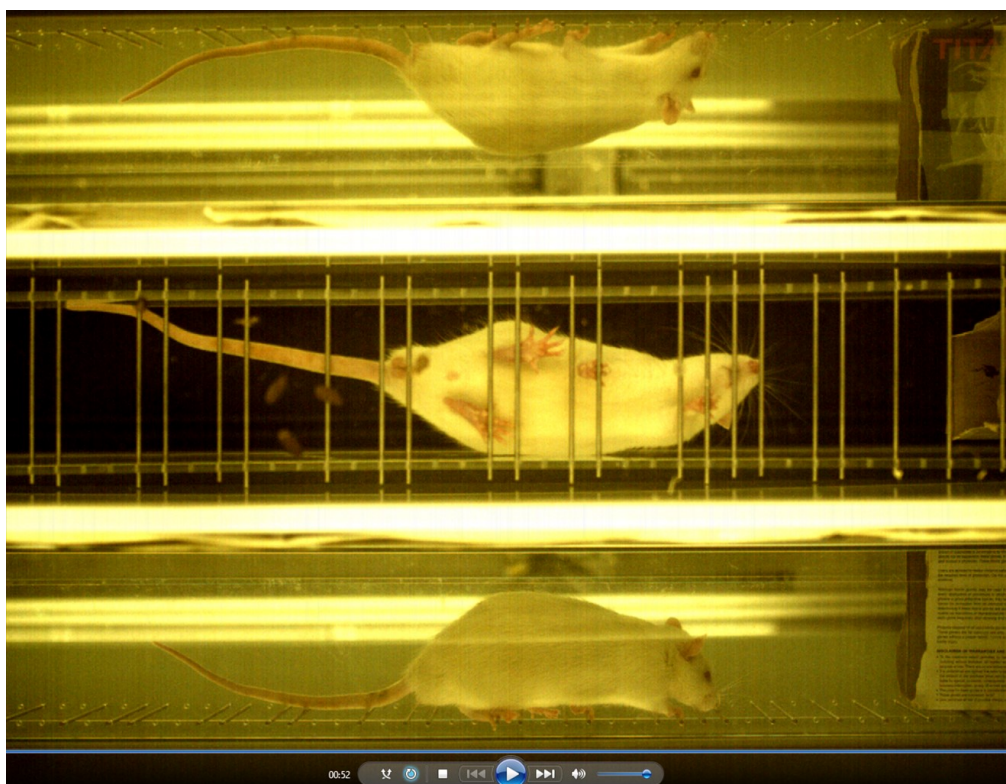
4 - Correction. Během kroku se potkan opravil, pokud minul příčku a zjistil, že šlape do prázdna mezi příčkami, tak tlapku opět zvedl a umístil ji na další příčku správně.

5 - Partial placement. Na příčku potkan umístil tlapku pouze částečně – pouze zápěstí/pata/prsty (viz obrázek č. 34).

6 - Correct placement. Správně provedený krok – středem tlapky stoupl na příčku a byla zapojena váha celého těla.



Obrázek 32. Total miss.



Obrázek 33. Slight slip.



Obrázek 34. *Partial placement.*

Pokud se současně vyskytly různé chyby, byla zaznamenána nejnižší hodnota daného skóre. Například, potkan nejprve umístil tlapku na příčku, pak ji přemístil na další ve stejném kroku (skóre 3), tlapka z příčky sklouzla a potkan nohou spadl do prázdna mezi příčkami (skóre 1). V tomto případě bylo zaznamenáno skóre 1. Pokud došlo k pádu, byla hodnocena pouze končetina, která iniciovala chybu, žádná z dalších končetin hodnocena nebyla, dokud zvíře nezměnilo polohu všech končetin (Metz & Whishaw, 2009).

6.4 Histologická a imunohistochemická analýza

Po 5 týdnech bylo behaviorální testování ukončeno a zvířata byla transkardiálně perfundována 4% roztokem paraformaldehydu v PBS (*phosphate – buffered saline*). Páteř s míchou byla ve stejném roztoku fixována po dobu jednoho týdne. Po týdnu byla mícha z páteřního kanálu vyjmuta a fixována opět v 4% roztoku paraformaldehydu v PBS. Mícha byla vyjmuta v délce přibližně 2 cm od středu léze kraniálním i kaudálním směrem. Tato část míchy byla zalita do parafínu a byly vytvořeny příčné řezy o tloušťce 5 μm . Jednotlivé míchy byly krájeny podél kraniokaudální osy a mezi jednotlivými řezy byla vzdálenost 1 mm.

Pro vyhodnocování se používal vždy střed léze a poté dalších 7 řezů kraniálním a kaudálním směrem (celkem 15 řezů). Pro vyhodnocení úbytku šedé a bílé hmoty byly tyto řezy barveny roztokem Luxol-fast blue (1 g Luxol-fast blue rozpuštěn ve 100 ml 96 % ethanolu s 5 ml 10% kyseliny octové). Takto připravené trvalé preparáty byly nafoceny na mikroskopu ZEISS AXIO Observer D1 (Carl Zeiss, Weimar, Německo). V programu ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) byly poté změřeny plochy zachované šedé a bílé hmoty na jednotlivých řezech.

Na imunohistochemickou analýzu určení velikosti gliové jizvy byla použita primární protilátka proti GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) konjugovaná s cyaninovým barvivem Cy3 (Sigma, St. Louis, MO, USA). GFAP je bílkovina, která se řadí do rodiny cytoskeletálních proteinů, a je hlavní součástí filament v maturovaných astrocytech CNS. Jedná se o monomerní molekulu (40 – 53 kDa) s vysokou specifitou pro CNS (v těle se vyskytuje pouze v CNS) (Eng, 1985). GFAP se při poškození astrocytů po traumatech CNS uvolňuje. Snímky byly pořízeny na mikroskopu ZEISS AXIO Observer D1 (Carl Zeiss, Weimar, Německo) a v programu ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) byla poté spočítána velikost gliové jizvy (GFAP pozitivní oblasti v okolí léze).

Jako marker pro určení počtu motoneuronů byla použita cholin acetyltransferáza (ChAT, *choline acetyltransferase*). Barvení pomocí ChAT se používá u cholinergních neuronů. Jako primární protilátka byla použita koží polyklonální protilátka proti ChAT_{1:75} (NBP1–30052). Jako sekundární protilátka byla použita oslí protilátka proti koží IgG konjugovaná s Alexa Fluor 488_{1:200} (A-11055). U motoneuronů bylo ještě v rámci imunohistochemické analýzy využito barvení 4',6-diamidin-2-fenylindolem (DAPI), což je marker buněčných jader. DAPI sloužilo především ke zpřesnění analýzy a ke kontrole, zda se opravdu jedná o motoneurony. Snímky byly pořízeny na mikroskopu ZEISS AXIO Observer D1 (Carl Zeiss, Weimar, Německo) a v programu ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) byl spočítán počet motoneuronů.

6.5 Statistická analýza

Pro stanovení, zda jsou rozdíly statisticky signifikantní mezi jednotlivými skupinami zvířat, byla použita dvoucestná Anova (two-way ANOVA). V případě behaviorálních testů, měření plochy gliové jizvy, měření množství bílé a šedé hmoty míšni a počtu motoneuronů byla použita obousměrná ANOVA s opakovaným měřením, jelikož jsem se chtěla podívat na to, jak se výsledky odlišných skupin měnily v čase. Veškeré grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Prism 8. Rozdíly byly považovány za statisticky signifikantní, pokud $p < 0,05$. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm střední chyba průměru (SEM). Signifikance v textu a v tabulkách u grafů je označena takto: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

7. Výsledky

7.1 Behaviorální testování

7.1.1 BBB test

Postupné zotavování zadních končetin bylo hodnoceno pomocí lokomočního testu BBB (*open field test*). Všechna zvířata byla testována každý týden po provedení operačního zákroku. Dle výsledků jsou patrné signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami.

Po operaci nebyly pozorovány významné rozdíly mezi skupinou, u které byla provedena laminektomie a u katétru skupiny. Skóre v BBB testu byly odlišné u levé a pravé zadní končetiny.

U levé nohy, ve skupinách laminektomie a katétru, se pohybovalo od 19,90 ($\pm 0,60$) jeden týden po SCI do 21 ($\pm 0,00$) ke konci experimentu, tedy 5. týden po SCI.

Ve skupině s lézí o objemu 10 μ l je patrné signifikantní poškození motorické funkce. První týden po zákroku měla zvířata skóre 11,45 ($\pm 1,95$) bodů, což je signifikantní rozdíl, pokud porovnáme výsledky se oběma výše zmíněnými kontrolními skupinami.

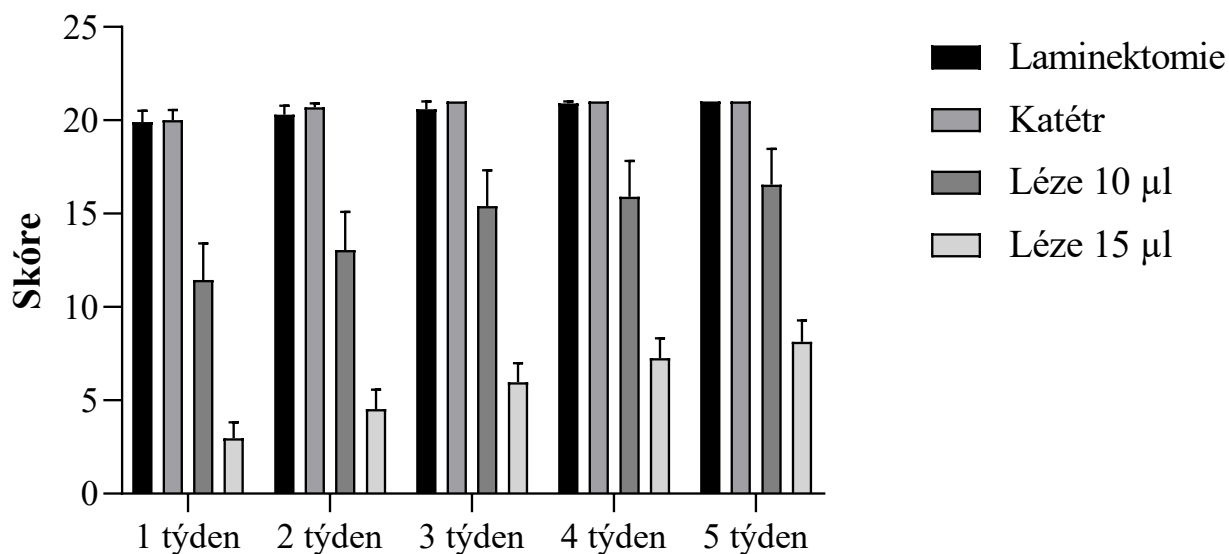
Během experimentu se motorická funkce u skupiny s lézí o objemu 10 μ l postupně zlepšovaly a výsledky BBB testu dosáhly až skóre 16,55 ($\pm 1,91$). Výsledky skupiny s lézí o objemu 15 μ l byly signifikantně odlišné, ať byly porovnány s jakoukoliv jinou experimentální skupinou.

U skupiny s lézí o objemu 15 μ l byl zaznamenán závažný lokomoční deficit. Tato zvířata měla v prvním týdnu po provedení SCI zákroku výsledky 2,96 ($\pm 0,87$). Pozorovaný rozdíl byl velmi signifikantní ($p < 0,001$). S dalším testováním bylo vidět mírné zlepšení a konečné skóre této skupiny v rámci BBB testu bylo 8,13 ($\pm 1,15$) (viz graf č. 1 + viz tabulka č. 2).

U pravé nohy zvířata u skupiny s laminektomií měla první týden po testování skóre 19,60 ($\pm 0,58$) a na konci experimentu, tedy pět týdnů po operaci měla tato skupina skóre 21,00 ($\pm 0,00$).

Výsledky skupiny s katétresem se u pravé nohy pohybovaly od 19,90 ($\pm 0,68$) první týden po operaci a na konci experimentu dosáhla zvířata výsledků 20,90 ($\pm 0,10$). Skupina s lézí o velikosti 10 μ l vycházela signifikantně nižší v porovnání se skupinou laminektomie, katétru a signifikantně vyšší v porovnání s výsledky skupiny 15 μ l. Skupina s lézí o objemu 15 μ l vycházela i na pravou nohu signifikantně nižší v porovnání se všemi ostatními skupinami (viz graf č. 2 + viz tabulka č. 3).

BBB test - levá noha



Graf 1. BBB skóre měřené na levé noze po dobu 5 týdnů po SCI. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$) a chybové úsečky představují \pm SEM.

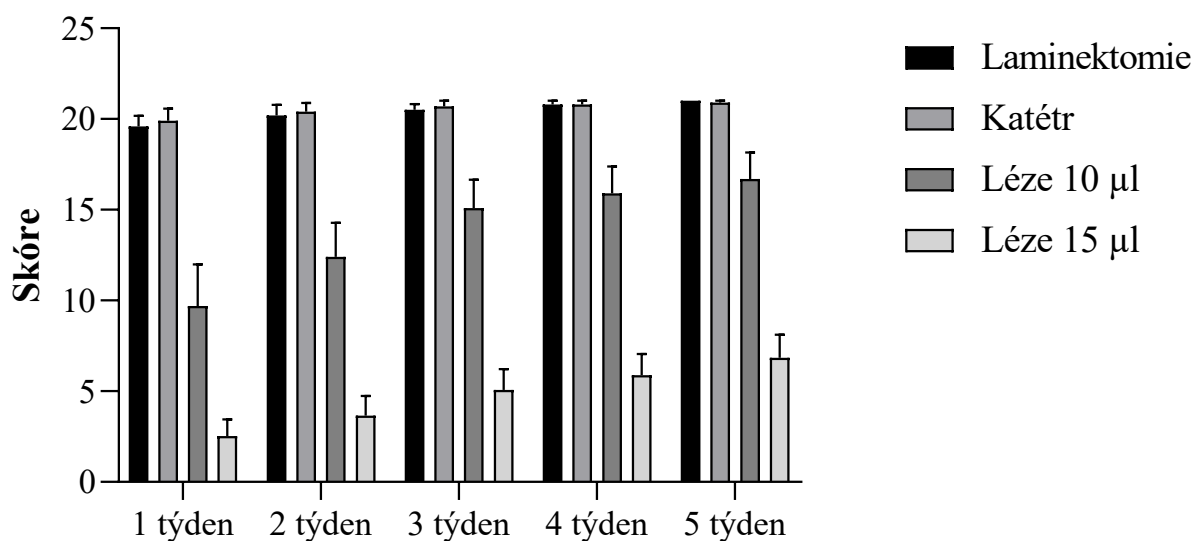
	Laminektomie	Katétr	Léze 10 µl	Léze 15 µl
1 týden	19,90 \pm 0,60 A**, B****	20,00 \pm 0,55 A**, B****	11,45 \pm 1,95 B****	2,96 \pm 0,87
2 týden	20,30 \pm 0,49 A*, B****	20,70 \pm 0,20 A**, B****	13,05 \pm 2,04 B****	4,54 \pm 1,03
3 týden	20,60 \pm 0,40 B****	21,00 \pm 0,00 B****	15,40 \pm 1,91 B****	5,96 \pm 1,03
4 týden	20,90 \pm 0,10 B****	21,00 \pm 0,00 B****	15,90 \pm 1,93 B****	7,27 \pm 1,05
5 týden	21,00 \pm 0,00 B****	21,00 \pm 0,00 B****	16,55 \pm 1,91 B****	8,13 \pm 1,15

Tabulka 2. Data a směrodatné odchylky a vyznačení signifikancí ke grafu číslo 1.

* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$);

A – vs. léze 10 µl ; B – vs. léze 15 µl; C – vs. katétr; D – vs. laminektomie

BBB test - pravá noha



Graf 2. BBB skóre měřené na pravé noze po dobu 5 týdnů po SCI.

Statistická signifikance je značena ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$) a chybové úsečky představují \pm SEM.

	Laminektomie	Katétr	Léze 10 µl	Léze 15 µl
1 týden	19,60±0,58 A***, B****	19,90±0,68 A****, B****	9,70±2,29 B***	2,54±0,92
2 týden	20,20±0,58 A**, B****	20,40±0,48 A**, B****	12,40±1,88 B****	3,65±1,09
3 týden	20,50±0,32 B****	20,70±0,30 B****	15,10±1,55 B****	5,08±1,15
4 týden	20,80±0,20 B****	20,80±0,20 B****	15,90±1,49 B****	5,88±1,17
5 týden	21,00±0,00 B****	20,90±0,10 B****	16,70±1,47 B****	6,83±1,28

Tabulka 3. Data a směrodatné odchylky a vyznačení signifikancí ke grafu číslo 2.

Legenda:

* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$);

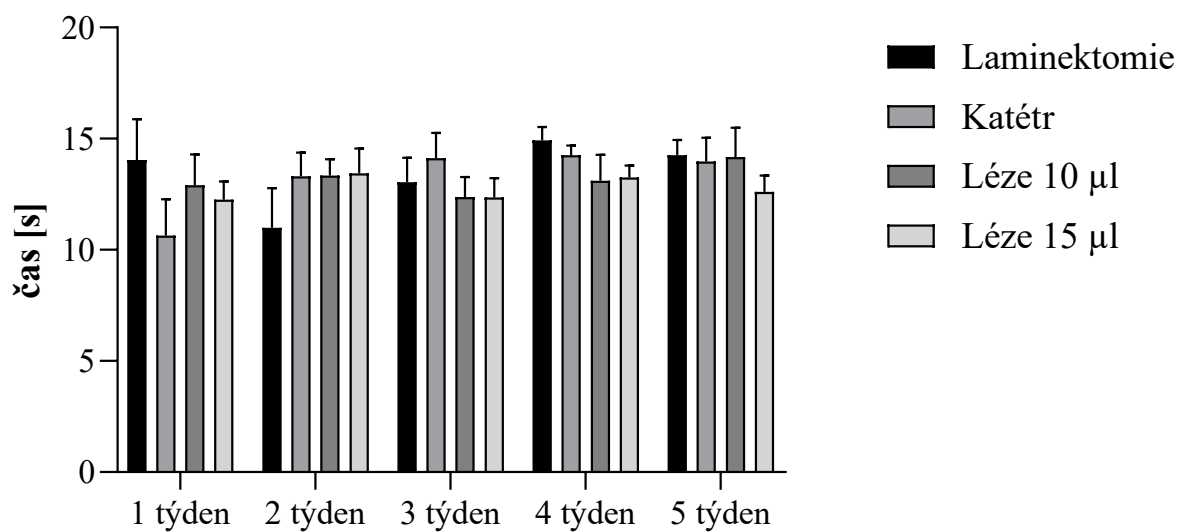
A – vs. léze 10 µl ; B – vs. léze 15 µl; C – vs. katétr; D – vs. laminektomie

7.2.2 Plantar test

Pro měření tepelné nocicepce byl použit Plantar test. Testování bylo prováděno každý týden po operaci. U tohoto testu se projeví rozdíly i mezi levou (viz graf č. 3 + viz tabulka č. 4) a pravou zadní končetinou (viz graf č. 4 + viz tabulka č. 5).

Na levé zadní končetině nebyly pozorovány prakticky žádné rozdíly. Na rozdíl od toho u pravé zadní končetiny se začala projevovat zvýšená citlivost k teplu již od 2. týdne po SCI u skupin s lézí o objemu 10 μ l a 15 μ l. Ve 3. a 4. týdnu testování bylo dosaženo výrazně kratší doby odtažení tlapky od stimulu mezi zvířaty ve skupině 15 μ l a zvířaty ve skupinách laminektomie a katétru ($p < 0,05$), což ukazuje, že se dříve nebolestivý podnět stal bolestivým (hyperalgezie). Během 5. týdne testování se projevilo mírné zlepšení. Toto zlepšení mělo za následek ztrátu statistické signifikance, ale čas odtažení tlapky od zdroje tepla u skupiny s lézí o objemu 15 μ l byl stále kratší než u všech ostatních skupin (laminektomie - 13,7 s, katétr - 14,6 s, 10 μ l - 14,5 s, 15 μ l - 11,6 s).

Plantar test - levá noha

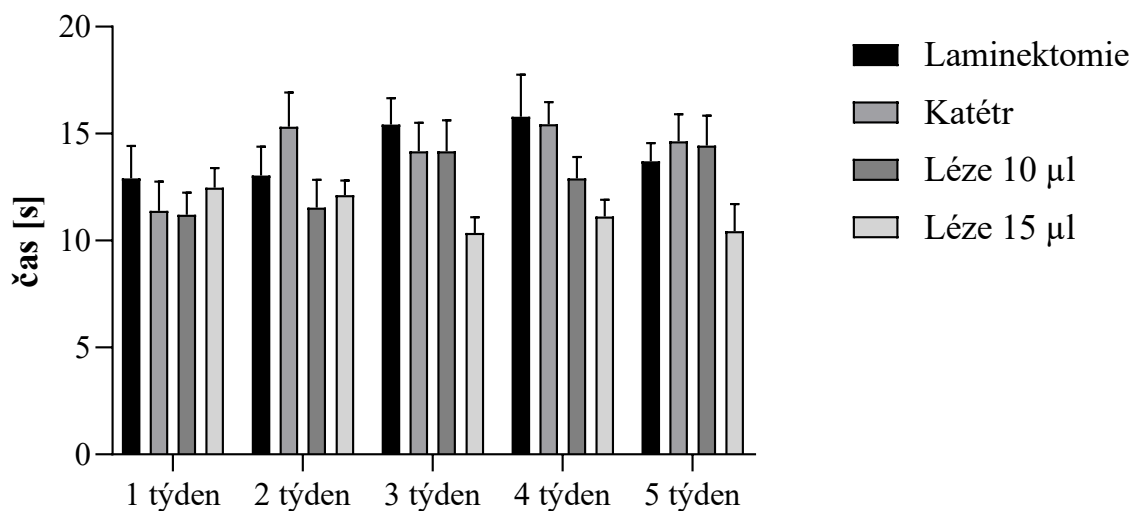


Graf 3. Plantar test měřící čas, po kterém dojde k odtažení levé končetiny po aplikaci tepelného stimulu. V tomto případě bez signifikance a chybové úsečky představují \pm SEM.

	Laminektomie	Katétr	Léze 10 µl	Léze 15 µl
1 týden	14,04±1,83	10,65±1,63	12,91±1,39	12,26±0,82
2 týden	10,99±1,79	13,31±1,07	13,33±0,75	13,44±1,11
3 týden	13,05±1,09	14,13±1,14	12,37±0,89	12,35±0,88
4 týden	14,92±0,61	14,26±0,42	13,11±1,16	13,27±0,53
5 týden	14,26±0,68	13,97±1,08	14,18±1,31	12,61±0,74

Tabulka 4. Data a směrodatné odchylky ke grafu číslo 3.

Plantar test - pravá noha



Graf 4. Plantar test měřící čas, po kterém dojde k odtážení pravé končetiny po aplikaci tepelného stimulu. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$) a chybové úsečky představují \pm SEM.

	Laminektomie	Katétr	Léze 10 µl	Léze 15 µl
1 týden	12,92±1,51	11,39±1,38	11,21±1,03	12,47±0,92
2 týden	13,04±1,35	15,33±1,59	11,55±1,29	12,13±0,68
3 týden	15,43±1,22 ^{B*}	14,17±1,33	14,17±1,45 ^{B*}	10,36±0,73
4 týden	15,80±1,96 ^{B*}	15,45±1,03	12,91±1,00	11,13±0,78
5 týden	13,71±0,84	14,63±1,27	14,45±1,40 ^{B*}	10,44±1,28

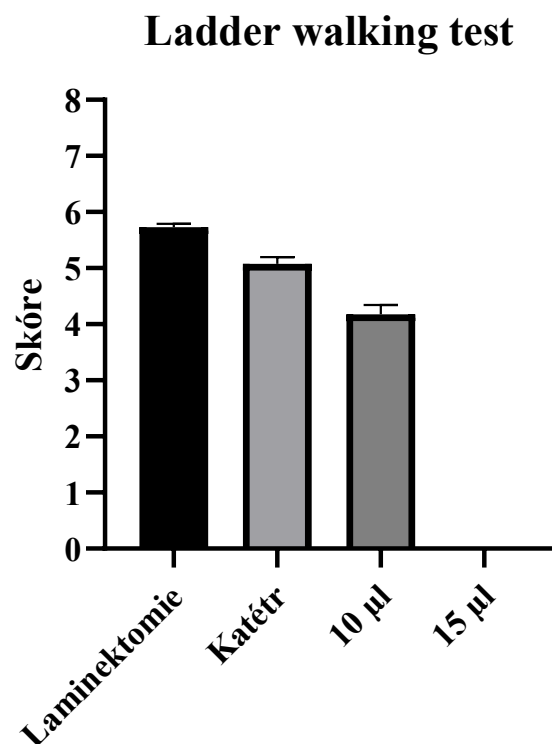
Tabulka 5. Data, směrodatné odchylky a vyznačení signifikancí ke grafu číslo 4.

Legenda: * ($P < 0,05$), ** ($P < 0,01$), *** ($P < 0,001$), **** ($P < 0,0001$);

A – vs. léze 10 µl; B – vs. léze 15 µl; C – vs. Katétr; D – vs. Laminektomie

7.2.3 Ladder walking

Pomocí tohoto testu byly testovány pokročilé koordinované lokomoční funkce. Zvířata přecházela žebřík a sledovalo se, jak přesně umísťují tlapky na nepravidelně uspořádané příčky žebříku. Test byl zařazen do posledního týdne testování (5. týden po SCI zákroku). Výsledky kontrolních skupin – zvířata s laminektomií dosáhla skóre 5,75 ($\pm 0,07$) a *sham* skupina 4,76 ($\pm 0,25$). U těchto skupin nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl. Potkani s lézí o objemu 10 μ l byli schopni přejít žebřík z jedné strany na stranu, ale chůze byla s větším počtem chyb. Tato zvířata dosáhla skóre 3,12 ($\pm 0,33$). Poslední skupina zvířat – zvířata s lézí o objemu 15 μ l – tito jedinci nebyli schopni žebřík překonat. Tato zvířata byla ohodnocena 0 body. V porovnání s ostatními skupinami se od sebe jednotlivé skupiny signifikantně lišily ($p < 0,001$, $p < 0,05$) (viz graf č. 5 + viz tabulka č. 6).



Graf 5. Ladder walking test. Motorický test, při kterém má potkan přejít z jedné strany aparatury na druhou přes žebřík. Každý krok je bodován dle stupnice viz. Kapitola 5.4.3. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$), ** ($P < 0,01$), *** ($P < 0,001$), **** ($P < 0,0001$) a chybové úsečky představují \pm SEM.

	Laminektomie	Katétr	Léze 10 µl	Léze 15 µl
Skóre	5,75±0,07 C****	4,76±0,25	3,12±0,33 C****, D****	0±0 A****, C****, D****

Tabulka 6. Data, směrodatné odchylky a vyznačení signifikancí ke grafu číslo 5.

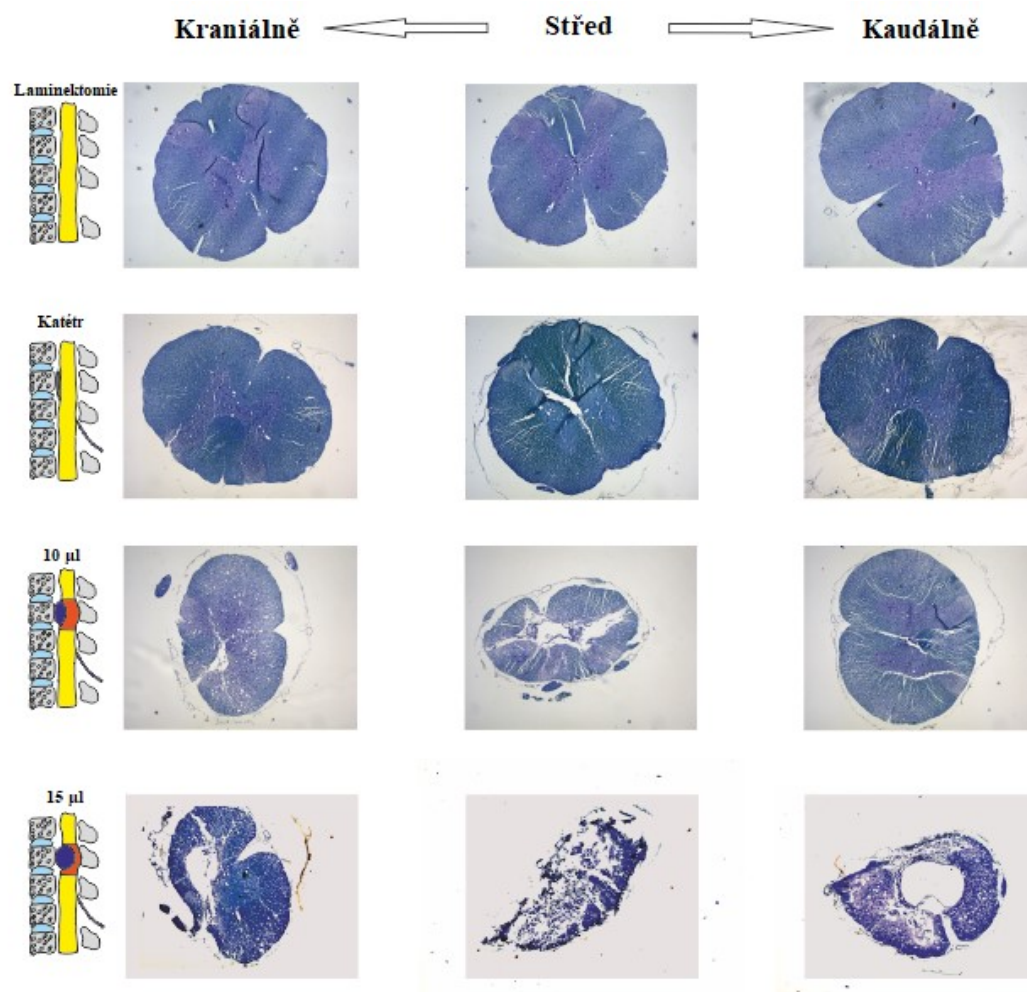
* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$);

A – vs. léze 10 µl ; B – vs. léze 15 µl; C – vs. katétr; D – vs. laminektomie

7.2 Histologická a imunohistochemická analýza

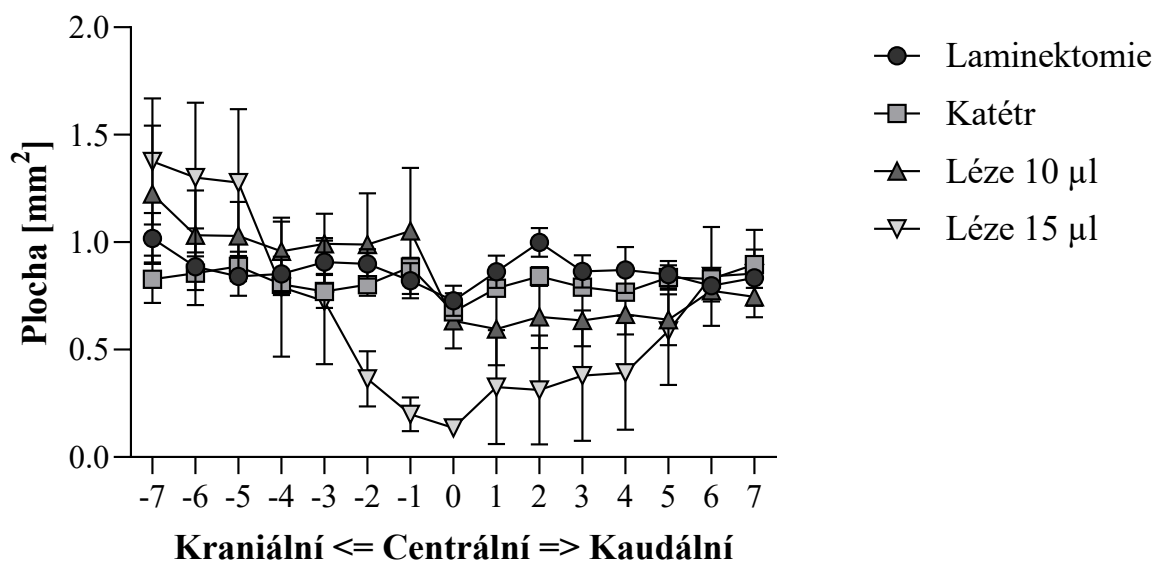
7.2.1 Zachování šedé a bílé hmoty

Po ukončení behaviorálního testování, zabití pokusných zvířat, vyjmutí míchy z páteřního kanálu, zafixování tkáně a vytvoření histologických preparátů, byla na transverzálních míšních řezech měřena plocha šedé (viz graf č. 6 + viz tabulka č. 7) a bílé (viz graf č. 7 + viz tabulka č. 8) hmoty. Plocha šedé a bílé hmoty míšní byla měřena v rozsahu 1,5 cm okolo středu léze. Měření probíhalo v pixelech (pomocí programu ImageJ) a výsledek byl poté přepočítán na mm². Histologické preparáty obsahovaly 15 axiálních histologických řezů (7 řezů kraniálně od středu léze, 1 řez ze středu léze a 7 řezů kaudálně od středu léze) (viz obrázek č. 35). Za střed léze byl považován řez, který měl zachováno nejméně míšní tkáně. Zvířata s lézí o objemu 15 µl měla signifikantně nejméně zachovanou míšní tkáň v porovnání s ostatními skupinami nejen ve středu léze, ale i kraniálně a kaudálně. Plocha bílé hmoty odhalila signifikantně nižší množství u obou skupin s lézí oproti skupině s katétrelem a laminektomií. Při porovnání skupin s lézí mezi sebou (10 µl a 15 µl) se ukázalo, že skupina s lézí o objemu 15 µl měla daleko méně zachovanou bílou hmotu míšní oproti skupině s lézí o objemu 10 µl.



Obrázek 35. Zachování šedé a bílé hmoty míšni na histologických řezech, které ukazují rozdíly mezi jednotlivými skupinami a zároveň rozdíly na úrovních jednotlivých řezů.

Množství šedé hmoty



Graf 6. Plocha zachované šedé hmoty měřená v rozsahu 7 mm kraniálně až 7 mm kaudálně od středu léze u zvířat 5 týdnů po SCI. Statistická signifikance je značena v tabulce pod grafem * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) a chybové úsečky představují \pm SEM.

Úroveň řezu	Laminektomie	Katétr	Léze 10 µl	Léze 15 µl
-7	1,02±0,12	0,83±0,11	1,22±0,32	1,38±0,29
-6	0,89±0,18	0,86±0,08	1,03±0,21	1,30±0,35
-5	0,84±0,09	0,89±0,07	1,03±0,16	1,28±0,34
-4	0,85±0,08	0,80±0,05	0,96±0,14	0,79±0,32
-3	0,91±0,10	0,77±0,08	0,99±0,14	0,73±0,29
-2	0,90±0,07	0,80±0,04	0,99±0,24 ^{B*}	0,36±0,13
-1	0,82±0,08	0,88±0,04 ^{B*}	1,05±0,30 ^{B**}	0,20±0,08
0	0,73±0,07	0,68±0,03	0,63±0,13	0,14±0,04
1	0,86±0,07	0,79±0,04	0,60±0,17	0,33±0,27
2	1,00±0,07 ^{B*}	0,84±0,04	0,65±0,15	0,31±0,25
3	0,86±0,07	0,79±0,04	0,64±0,12	0,38±0,30
4	0,87±0,11	0,77±0,04	0,66±0,09	0,39±0,27
5	0,85±0,06	0,84±0,06	0,64±0,12	0,59±0,25
6	0,80±0,04	0,83±0,05	0,77±0,05	0,84±0,23
7	0,83±0,03	0,90±0,07	0,75±0,04	0,85±0,20

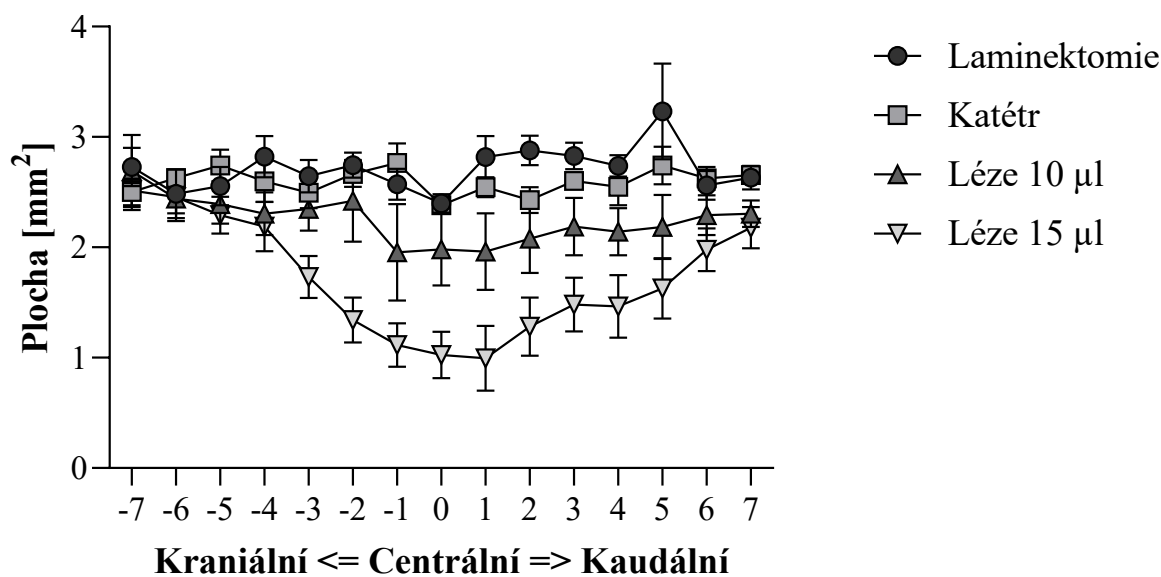
Tabulka 7. Data, směrodatné odchylky a vyznačení signifikancí ke grafu číslo 6.

Legenda:

* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$);

A – vs. léze 10 µl; B – vs. léze 15 µl; C – vs. katétr; D – vs. laminektomie

Množství bílé hmoty



Graf 7. Plocha zachované bílé hmoty měřená v rozsahu 7 mm kraniálně až 7 mm kaudálně od středu léze u zvířat 5 týdnů po SCI. Statistická signifikance je značena v tabulce pod grafem * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$) a chybové úsečky představují \pm SEM.

	Laminektomie	Katétr	Léze 10 μ l	Léze 15 μ l
-7	2,73 \pm 0,17	2,50 \pm 0,12	2,69 \pm 0,33	2,52 \pm 0,18
-6	2,48 \pm 0,22	2,63 \pm 0,05	2,44 \pm 0,20	2,45 \pm 0,15
-5	2,56 \pm 0,17	2,74 \pm 0,14	2,39 \pm 0,18	2,29 \pm 0,17
-4	2,82 \pm 0,19	2,60 \pm 0,19	2,31 \pm 0,19	2,19 \pm 0,22
-3	2,65 \pm 0,15	2,49 \pm 0,14	2,35 \pm 0,20	1,73 \pm 0,19
-2	2,75 \pm 0,11 B****	2,66 \pm 0,12 B***	2,42 \pm 0,37 B**	1,34 \pm 0,21
-1	2,57 \pm 0,14 B****	2,77 \pm 0,18 A*, B****	1,96 \pm 0,44 B*	1,12 \pm 0,20
0	2,40 \pm 0,08 B***	2,38 \pm 0,07 B***	1,98 \pm 0,33 B***	1,03 \pm 0,21
1	2,82 \pm 0,19 A*, B****	2,55 \pm 0,09 B****	1,96 \pm 0,35 B**	1,00 \pm 0,29
2	2,88 \pm 0,13 A*, B****	2,43 \pm 0,12 B**	2,08 \pm 0,31 B*	1,28 \pm 0,26
3	2,83 \pm 0,12 B***	2,60 \pm 0,05 B**	2,19 \pm 0,26	1,48 \pm 0,24
4	2,74 \pm 0,10 B***	2,55 \pm 0,17 B**	2,14 \pm 0,21	1,46 \pm 0,28
5	3,23 \pm 0,43 A**, B****	2,74 \pm 0,17 B**	2,18 \pm 0,29	1,63 \pm 0,27
6	2,56 \pm 0,13	2,63 \pm 0,10	2,29 \pm 0,18	1,98 \pm 0,19
7	2,63 \pm 0,11	2,65 \pm 0,07	2,31 \pm 0,12	2,18 \pm 0,19

Tabulka 8. Data, směrodatné odchylky a vyznačení signifikancí ke grafu číslo 7.

Legenda:

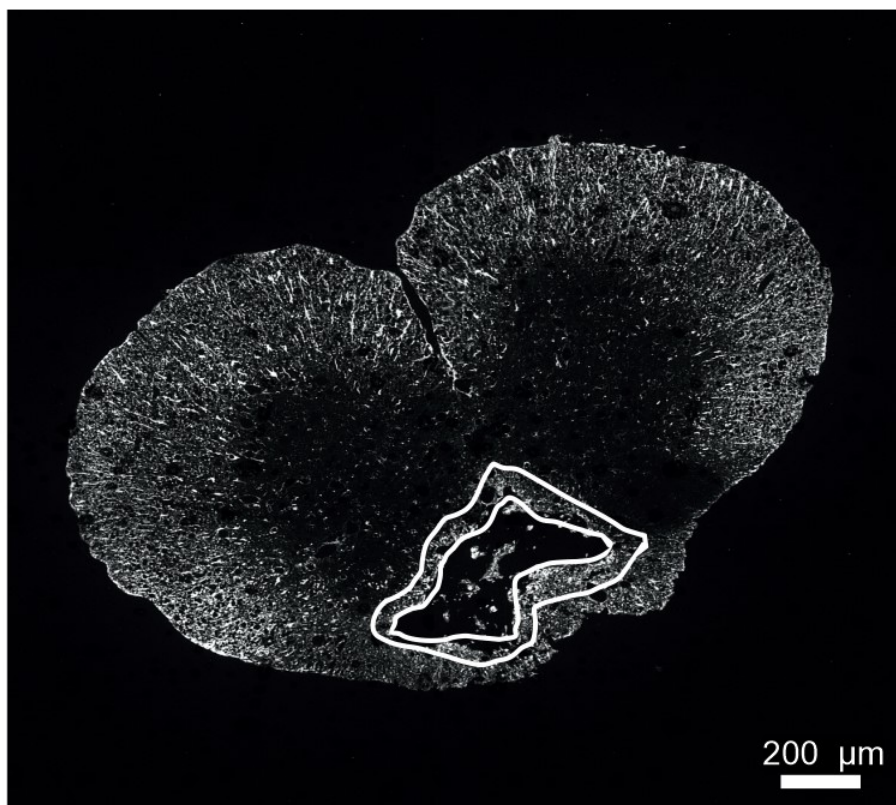
* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$);

A – vs. léze 10 μ l; B – vs. léze 15 μ l; C – vs. katétr; D – vs. laminektomie

7.2.2 Gliová jizva

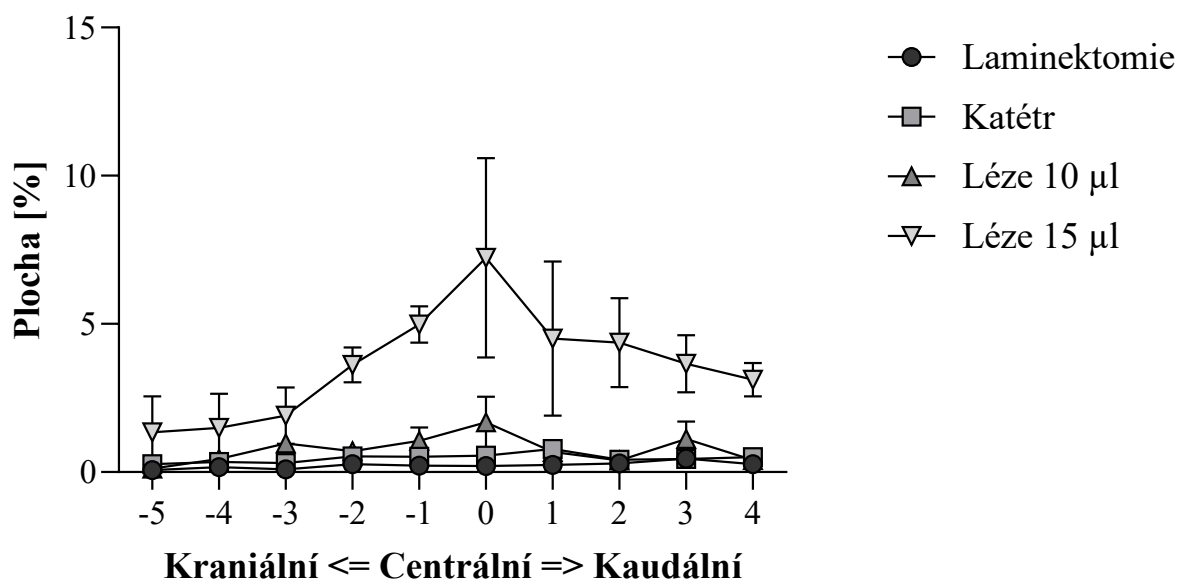
Na imunohistochemických preparátech byla zkoumána míra vzniku gliové jizvy pomocí měření GFAP–pozitivní oblasti (viz obrázek č. 36). Barvení bylo provedeno na 10 axiálních řezech (5 řezů kraniálně od středu léze, 1 ze středu léze a 4 kaudálně od středu léze). Za střed léze byl považován řez, který měl zachováno nejméně míšní tkáň.

Plocha jizvy byla měřena v pixelech a výsledek byl vyjádřen jako procentuální podíl celkové plochy míšního řezu (viz graf č. 8 + viz tabulka č. 9). Za střed léze byl považován řez s nejméně zachovanou míšní tkání. V obou nezraněných (laminektomie a katétr) skupinách a ve skupině s lézí o objemu 10 μ l skupině byla astroglióza nižší než 1 % z celkové plochy řezu. Naopak u zvířat s lézí o objemu 15 μ l byla pozorována významně větší gliová jizva než u zvířat z ostatních skupin. Nejvýraznější gliová jizva je u zvířat s lézí o objemu 15 μ l s píkem ve středu léze ($7,23 \pm 3,37$ %).



Obrázek 36. Měření velikosti gliové jizvy kolem centrální dutiny – gliová jizva je označena na obrázku bílým ohraničením. Na imunohistochemickou analýzu určení velikosti gliové jizvy byla použita primární protilátka proti GFAP konjugovaná s cyaninovým barvivem Cy3 (Sigma, St. Louis, MO, USA). GFAP se při postižení astrocytů po traumatech CNS uvolňuje. Snímky byly pořízeny na mikroskopu ZEISS AXIO Observer D1 (Carl Zeiss, Weimar, Německo). Na snímku je vidět měřítko 200 μ m.

Gliová jizva



Graf 8. Velikost gliové jizvy vyjádřená jako procentuální podíl celkové plochy transversálního míšního řezu u zvířat 5 týdnů po SCI. Oblast měření zahrnovala 5 mm kraniálním až 4 mm kaudálním směrem od středu léze. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$) a chybové úsečky představují \pm SEM.

Úroveň řezu	Laminektomie	Katétr	Léze 10 µl	Léze 15 µl
-5	0,07±0,02	0,27±0,12	0,12±0,07	1,35±1,22
-4	0,17±0,09	0,35±0,12	0,44±0,16	1,49±1,15
-3	0,09±0,05	0,30±0,08	0,97±0,27	1,90±0,95
-2	0,27±0,21 B*	0,53±0,20 B*	0,70±0,19	3,61±0,59
-1	0,22±0,13 B**	0,52±0,19 B***	1,06±0,45 B**	4,99±0,62
0	0,21±0,11 B****	0,55±0,15 B****	1,68±0,87 B****	7,23±3,37
1	0,24±0,16 B**	0,78±0,30 B**	0,69±0,25 B**	4,51±2,60
2	0,29±0,15 B*	0,41±0,20 B**	0,39±0,17 B**	4,37±1,51
3	0,46±0,25	0,45±0,16 B*	1,12±0,59	3,65±0,97
4	0,27±0,11	0,50±0,11	0,41±0,06	3,12±0,57

Tabulka 9. Data, směrodatné odchylky a vyznačení signifikancí ke grafu číslo 8.

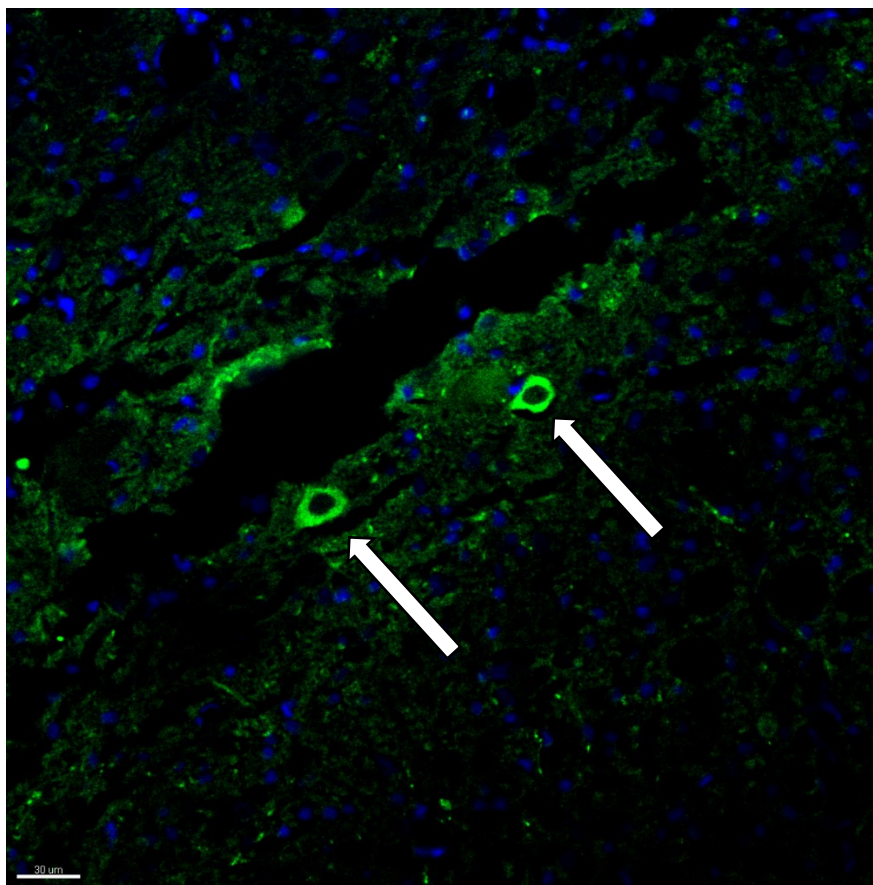
Legenda:

* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$);

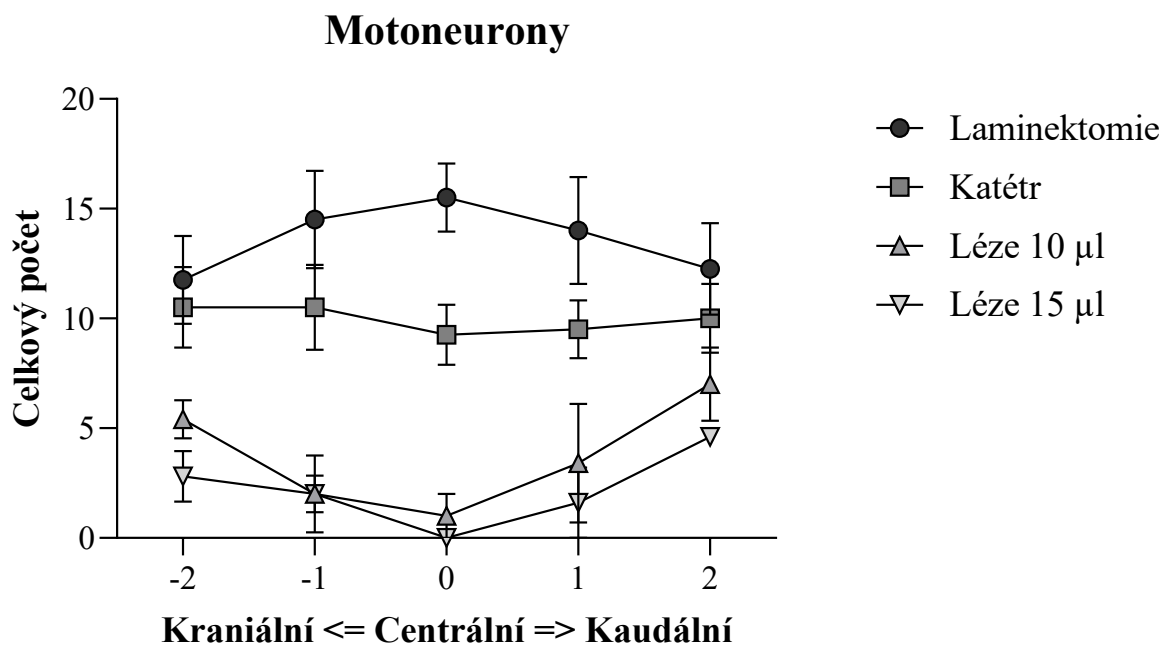
A – vs. léze 10 µl; B – vs. léze 15 µl; C – vs. katétr; D – vs. laminektomie

7.2.3 Motoneurony

Počet motoneuronů byl spočítán na základě počtu ChAT–pozitivních neuronů (viz obrázek č. 37) a to na 5 axiálních řezech (2 řezy kranálně od středu léze, 1 řez ze středu léze a 2 řezy kaudálně od středu léze) (viz graf č. 9 + viz tabulka č. 10). Za střed léze byl považován řez, který měl zachován nejméně míšní tkáň. Významně snížený počet motoneuronů byl pozorován v obou skupinách s provedenou lézí – 15 μ l a 10 μ l, ve srovnání se zvířaty z neporaněných skupin – laminektomie a katétr. Průměrný počet motoneuronů ve skupinách SCI kolísal od 0 do 5,9, zatímco u zvířat z neporaněných skupin byl počet motoneuronů v rozmezí od 9 až 21. Mezi katétr skupinou a skupinou s provedenou laminektomií nebyly pozorovány prakticky žádné rozdíly.



Obrázek 37. Snímek z mikroskopu ZEISS AXIO Observer D1 (Carl Zeiss, Weimar, Německo) ukazující barvení motoneuronů (označeny šipkou) pomocí ChAT. Jako primární protilátka byla použita koží polyklonální protilátka proti ChAT_{1:75} (NBPI–30052) a jako sekundární protilátka byla použita oslí protilátka proti koží IgG konjugovaná s Alexa Fluor 488_{1:200} (A–11055). V rámci imunohistochemické analýzy bylo využito barvení DAPI ke zpřesnění analýzy a ke kontrole, zda se opravdu jedná o motoneurony. Na snímku je vidět měřítko 30 μ m.



Graf 9. Celkový počet motoneuronů spočítaný na transverzálních míšních řezech u zvířat 5 týdnů po SCI. Oblasti, kde byl počet motoneuronů měřený, zahrnovala 2 mm kraniálním až 2 mm kaudálním směrem od středu léze. Statistická signifikance je značena * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$) a chybové úsečky představují \pm SEM.

Úroveň řezu	Laminektomie	Katétr	Léze 10 µl	Léze 15 µl
-2	11,75±2,02 A*, B**	10,50±1,85 B**	5,40±0,87	2,80±1,16
-1	14,5±2,22 A****, B****	10,50±1,94 A**, B**	2,00±0,84	2,00±1,76
0	15,5±1,55 A****, B****	9,25±1,38 A**, B***	1,00±1,00	0
1	14,00±2,45 A****, B****	9,50±1,32 A*, B**	3,40±2,71	1,60±1,6
2	12,25±2,10 B**	10,00±1,58	7,00±1,67	4,60±0,4

Tabulka 10. Data, směrodatné odchylky a vyznačení signifikancí ke grafu číslo 9.

Legenda:

* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$);

A – vs. léze 10 µl ; B – vs. léze 15 µl ; C – vs. katétr; D – vs. laminektomie

8. Diskuse

Cílem vymyslet vhodnou léčbu pro pacienty s míšním poraněním se i v současné době zabývá velké množství pracovišť napříč celým světem. Mnoho vědců a jejich výzkumné skupiny se snaží vyvinout nové možnosti pro léčbu SCI a tento směr výzkumu se tak stal neodmyslitelnou součástí experimentální medicíny. Aby tento úkol byl úspěšně splněn, tak je nutné vytvořit takový model, který bude co možná nejbližší samotnému míšnímu poranění u lidí. V mé práci představuji experimentální potkaní model, který je poměrně snadno reprodukovatelný a vychází z kompresního modelu SCI a zároveň z faktu, že míšní poranění u lidí vzniká zpravidla z ventrální strany míchy.

V roce 2001 byla publikována studie ze Slovenské Akademie věd na kompresní balónkovou lézi, kdy byl katétr zaveden z dorsální strany míchy. Studie ukázala, že takto vytvořený model je poměrně jednoduchý a snadno reprodukovatelný. (Vanický et al., 2001). V této práci bylo využito stejného operačního postupu, jediný rozdíl byl pouze v umístění katétru po odstranění oblouků obratlů na úrovni Th10.

Ventrální umístění katétru do námi určené polohy na úrovni míchy vyžadovalo pečlivou chirurgickou práci. Proto, aby nedošlo k poškození míšní tkáně během chirurgické zákroku, byl použit operační mikroskop. Čím větší léze byla vytvořena, tím byl pozorován závažnější úbytek míšní tkáně a závažnější poškození míšní tkáně. Dá se tedy říct, že velikost léze je přímo úměrná velikosti úbytku a míře poškození míšní tkáně. V rámci práce byly porovnávány dvě skupiny zvířat s lézí o velikosti 10 μ l a 15 μ l a jako kontrolní skupiny sloužila zvířata, kterým byla provedena pouze laminektomie a jedinci, kterým byl pouze vsunut katétr do ventrální oblasti míchy, ale balónek na jeho konci nebyl během zákroku nafouknutý. Velikost léze byla hodnocena prostřednictvím histologické (zachování šedé a bílé hmoty míšní) a imunohistochemické (astroglióza, počet motoneuronů) analýzy a motorické funkce byly hodnoceny na základě behaviorálních testů (BBB test, *Ladder walking* test, Plantar test). To, že pouhé zasunutí katétru (bez nafouknutí) nezpůsobuje poranění, nám potvrdila jedna z kontrolních skupin. U skupiny s nenafouknutým katétrem nedošlo ani k významnému porušení motorických a senzorických funkcí, tak ani k poškození míšní tkáně a nebyla pozorována ani výrazná astroglióza. Menší odchylky ve výsledcích behaviorálních testů můžeme vysvětlit jako pravděpodobný následek samotné operace jako například vznik epidurálního hematomu, případně poškození epidurálního prostoru, nebo svalů v okolí páteřního kanálu.

Abychom získaly představu o tom, jak bude vypadat model mírného a těžkého poranění míchy, tak jsme se rozhodli, že porovnáme dvě skupiny, v každé skupině nafoukneme balóněk umístěný na konci katétru na jiný objem – 10 μ l a 15 μ l. Ve skupině s lézí o objemu 10 μ l byla v BBB testu pozorována počáteční neschopnost kroku podpořeného váhou vlastního těla, změna při umístování tlapky a změna koordinace během jednotlivých kroků. Během behaviorálního testování se tyto odchylky od normálních motorických funkcí postupně zlepšovaly a na konci testování přinesly výsledky behaviorálních testů model s klinickým obrazem mírné paraparézy, došlo tedy k částečné ztrátě schopnosti v aktivním volném pohybu, k oslabení svalů dolních končetin a mírné ochrnutí dolní poloviny těla. Koordinace končetin byla prokázána na *Ladder walking* testu zvýšeným počtem chybných kroků během přecházení žebříku z jedné strany na druhou. Dále byl u této skupiny pozorován mírný úbytek míšní tkáně kaudálně směrem od léze a zároveň byl pozorován snížený počet motoneuronů. Gliová jizva v této skupině byla daleko větší v porovnání s kontrolními skupinami. Došlo tedy k vyššímu stupni zapojení astrocytů do regeneračních procesů a tím pádem i ke vzniku jizvy, která má za úkol oddělit zdravou tkáň od té poškozené a zabránit tak dalšímu šíření poranění.

Komprese míchy balónkem nafouknutým na 15 μ l měla za následek vážný neurologický deficit a zároveň prakticky úplnou paraplegii v prvním týdnu po operačním zákroku. Motorické funkce se postupně spontánně zlepšovaly během dalších týdnů testování. Ale v rámci BBB testu dosáhla zvířata maximálně 7,5 bodu, což znamená, že zvířata nebyla schopná chodit s podporou váhy vlastního těla – obnovila se tedy pohyblivost v jednotlivých kloubech, ale zvířata se na zadní tlapky pořádně nepostavila a jejich pohyb prakticky zprostředkovávaly pouze přední končetiny. *Ladder walking* test ukázal, že zvířata nebyla vůbec schopna přejít žebřík z jedné strany na druhou a na Plantar testu byla pozorována výrazně zvýšená hyperalgie u pravých dolních končetinách u všech zvířat ze skupiny. Výraznější hyperalgie na pravé straně byla pravděpodobně způsobena tím, že při operaci byl katétr podsouván pod míchu z pravé strany míšního kanálu. U testů motorických funkcí (BBB test a *Ladder walking* test) nebyly pozorovány horší výsledky na pravé straně těla v porovnání s levou stranou. Dá se tedy předpokládat, že umístění katétru ovlivňuje přední senzory spinothalamický trakt. Závažný úbytek míšní tkáně koreloval se zvýšenou tvorbou gliové jizvy a signifikantně sníženým počtem motoneuronů. Ukázal se tedy nepřímý úměrný vztah mezi velikostí gliové jizvy a množstvím míšní tkáně (jinak řečeno tkáň prakticky zachována nebyla a vzniklá jizva byla největší v této skupině).

Při porovnání studie publikované Slovenskou Akademií věd z roku 2001 vyšly výsledky behaviorálních testů při provedení zákroku z dorsální strany a nafouknutím katétru srovnatelné (Vanický et al., 2001). Oddělení Regenerace nervové tkáně na Ústavu experimentální medicíny AV ČR publikovalo i jiné studie, kde byla do experimentů použita zvířata s lézí provedenou z dorsální strany a pomocí balónkové komprese. V těchto studiích však zvířata s velikostí léze o objemu 15 μ l měla daleko horší výsledky v BBB testu (zvířata měla o 1 až 2 body méně hodnotící škály) (Amemori et al., 2013; Urdžíková et al., 2014; Růžicka et al., 2018; Svobodová et al., 2019). Tento rozdíl může být způsoben nepřímým stlačením kortikospinálního traktu, který je u potkanů lokalizován z dorsální strany. Ovšem podle histologických řezů bylo patrné, že zase model provedený zákrokem z ventrální strany je ovlivněn přítomností *fissury mediany anterior*. *Fissura mediana anterior* je vlastně přední zářez mezi předními rohy, který vede po celé délce míchy. Při zákroku došlo k tomu, že katétr s balónkem byl umístěn přímo do tohoto zářezu a tím pádem komprese nebyla tak velká jako při provedení zákroku z dorsální strany, kde tento zářez není. Katétr *de facto* mechanicky oddělil dvě poloviny míchy od sebe a až poté nastala komprese míšní tkáně. U skupiny s lézí o objemu 10 μ l právě toto vedlo k nehomogenitě výsledků v této skupině. U skupiny s lézí o velikosti 15 μ l se negativní důsledky přítomnosti fissury zmenšily a toto poranění vytvořilo klinický obraz závažného SCI.

Z pohledu klinické relevance jsou pravděpodobně nejvhodnějšími modely kompresní a kontuzní (Kwon et al., 2010; Lee & Lee, 2013). Míšní poranění u lidí je nejčastěji následek silného mechanického nárazu na míchu, který způsobí zlomení obratlů a dislokaci odlomených kostních fragmentů. K pohmoždění míchy u experimentálních modelů nejčastěji dochází nárazem, a to buď váhovým anebo elektromagnetickým (Gruner, 1992; Young, 2009). Tento model má však svá úskalí, mezi která patří například variabilita spojená s funkčním zotavením v období po SCI (Khan et al., 1999; Talac et al., 2004). Aby byla takto experimentálně provedená léze konzistentnější, využívají se digitalizované přístupy, kdy je páteř i tělo potkanů stabilizováno a pohmoždění míchy je řízeno počítačem (Krishna et al., 2013).

Kompresní model SCI lze vytvořit balónkovou technikou, jak tomu bylo v této práci, nebo pomocí svorky, kterou je mícha stlačena. Ve svorkových modelech, které byly poprvé popsány v roce 1978 (Rivlin & Tator, 1978), byly použity kalibrované svorky vyvíjející sílu 35 – 50 g. Pomocí svorky byla mícha stlačena z bočních stran, což ovšem není běžný mechanismus lidského poranění. Akutní komprese dorsální míchy vyvolaná balónkem se široce používá u potkanů, psů, králíků nebo primátů (Aslan et al., 2009). V rámci vytváření modelů byly i pokusy s experimentálními ventrálními lézemi. Tyto modely byly vytvářeny pomocí implantovaných šroubů. Do těla obratle byl implantován šroub, který měl za úkol způsobit kompresi míchy

z ventrální strany (Hukuda et al., 1972; Lee et al., 2012). Tento způsob je však velmi komplikovaný, pokud jde o provedení samotného chirurgického zákroku a získání správné polohy šroubu. Pokud tento model tedy porovnáme s balónkovou kompresí, tak je nafouknutí balónku daleko rychlejší (řády sekund) a celkově daleko jednodušší na provedení v porovnání s implantováním šroubu do páteřního obratle.

V této práci jsem představila model SCI, který je vysoce klinicky relevantní, co se týče komprese míchy z ventrální strany. Vzhledem k dobře známému a relativně nekomplikovanému přístupu k míše z dorsální strany, je tato metoda i poměrně snadno reprodukovatelná a při vhodně zvoleném objemu, na který je balónek nafukován, je i stupeň závažnosti traumatu u laboratorních potkanů odpovídající poranění u lidí.

Závěr

Tato práce se zabývala vytvořením klinicky co možná nejrelevantnějšího, poměrně snadno proveditelného a finančně co nejméně náročného modelu SCI u laboratorního potkana.

Po provedení operačního zákroku u poraněných (léze 10 μ l a 15 μ l) i kontrolních (katétr a laminektomie) skupin, prošla zvířata pětítýdenním behaviorálním testováním, kdy byly sledovány motorické a senzorické funkce jednotlivých zvířat. Po skončení behaviorálního testování byla zvířata usmrcena transkardiální perfúzí, mícha byla zafixována v 4% roztoku paraformaldehydu v PBS a poté byly sledovány patofyziologické procesy probíhající po poranění míchy prostřednictvím histologických a imunohistochemických metod. V rámci těchto metod byla pozornost zaměřena na velikost gliové jizvy, počet motoneuronů a množství zachované šedé a bílé míšní tkáně.

Po vyhodnocení jednotlivých testů, histologických a imunohistochemických metod byly výsledky jednotlivých skupin porovnány mezi sebou. Výsledky ukázaly, že existuje korelace mezi vznikem a velikostí gliové jizvy a úbytkem míšní tkáně u poraněných zvířat. Zvířata s větší lézí měla signifikantně větší gliovou jizvu, největší deficit v množství šedé i bílé míšní tkáně a v rámci behaviorálních testů měla i nejvíce zhoršené motorické funkce. Kontrolní skupiny – katétr a laminektomie – si během vyhodnocování stály velmi podobně a nebyly pozorovány prakticky žádné signifikantní rozdíly mezi nimi. Jedinci s lézí o objemu 10 μ l měli poměrně nehomogenní výsledky, což je pravděpodobně způsobeno přítomností předního zářezu míšního, došlo tedy ke zmírnění dopadu poranění na míchu samotnou, ale i přesto tato zvířata byla prakticky ve všech testech signifikantně horší v porovnání s kontrolami, zároveň však signifikantně lepší v porovnání se skupinou s lézí o objemu 15 μ l.

Tato práce tedy přišla s novým, poměrně snadno reprodukovatelným ventrálním kompresním modelem experimentální míšní léze u potkana, který zároveň ověřila. Celý operační zákrok byl proveden pomocí nafouknutého balónku umístěného na konci Fogartyho katétru. V případě použití tohoto modelu, co nejpresnějším klinickým obrazem, by mělo být dodrženo nafouknutí balónku na 15 μ l.

Seznam použité literatury

- *Eger, E. I. (1981). Isoflurane: a review. *Anesthesiology*, 55(5): 559–576.
- *Anwar, M. A., Al Shehabi, T. S. and Eid, A. H. (2016). Inflammogenesis of secondary spinal cord injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10(4): 1–24.
- *Becker, D., Sadowsky, C. L. and McDonald, J. W. (2003). Restoring function after spinal cord injury. *The Neurologist*, 9:1–15.
- *Bican, O., Minagar A. and Pruitt, A. A. (2013). The spinal cord: a review of functional neuroanatomy. *Neurologic clinics*, 31(1):1–18.
- *Cheriyian, T., Ryan, D. J., Weinreb, J. H., Cheriyian, J., Paul J. C., Lafage, V., Kirsch, T. and Errico, T. J. (2014). Spinal cord injury models: a review. *Spinal cord*, 52(8):588–595.
- *Meldrum, B. S. (2000). Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. *The Journal of Nutrition*, 130(4): 1007S–1015S.
- *Oyinbo, C. A. (2011). Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 71: 281–299.
- *Park, E., Velumian, A. A. and Fehlings, M. G. (2004). The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: A review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *Journal of Neurotrauma*, 21(6): 754–774.
- *Platt, S. R. (2007). The role of glutamate in central nervous system health and disease—a review. *The Veterinary Journal*, 173(2): 278–286.
- *Tator, C. H. and Fehlings, M. G. (1991) Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *Journal of Neurosurgery*, 75:15–26.
- Aki, T. and Toya, S. (1984). Experimental study on changes of the spinal-evoked potential and circulatory dynamics following spinal cord compression and decompression. *Spine*, 1984 9: 800–809.
- Allan, S. M. and Rothwell, N. J. (2003). Inflammation in central nervous system injury. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 358: 1669–1677.
- Allen, A. R. (1911) Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. *Journal of the American Medical Association*, LVII (11), 878.
- Amemori, T., Romanyuk, N., Jendelova, P., Herynek, V., Turnovcova, K., Prochazka, P., Kapcalova, M., Cocks, G., Price, J. and Sykova, E. (2013). Human conditionally immortalized neural stem cells improve locomotor function after spinal cord injury in the rat. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(3): 68–68.

* označení review

- Anderson, D. K., Means, E. D., Waters, T. R. and Green, E. S. (1982). Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. *Journal of Neurosurgery*, 56:106–113.
- Aslan, A., Cemek, M., Eser, O., Altunbaş, K., Buyukokuroglu, M. E., Cosar, M., Baş, O., Ela, Y. and Fidan, H. (2009). Does dexmedetomidine reduce secondary damage after spinal cord injury? An experimental study. *European Spine Journal*, 18(3): 336.
- Azbill, R. D., Mu, X., Bruce-Keller, A. J., Mattson, M. P. and Springer, J. E. (1997). Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain research*, 765(2): 283–290.
- Beattie, M. S., Bresnahan, J. C., Komon, J., Tovar, C. A., Van Meter, M., Anderson, D. K., Faden, A. I., Hsu, C. Y., Noble, L. J., Salzman, S. and Young, W. (1997). Endogenous repair after spinal cord contusion injuries in the rat. *Experimental neurology*, 148(2): 453–463.
- Bentley, K. W., Hardy, D. G. and Meek, B. (1967). Novel analgesics and molecular rearrangements in the morphine-thebaine group. II. Alcohols derived from 6, 14–endoetheno– and 6, 14–endoethenotetrahydro–thebaine. *Journal of the American Chemical Society*, 89: 3273–3280.
- Blesch, A. and Tuszynski, H. M. (2009). Spinal cord injury: plasticity, regeneration, and the challenge of translational drug development. *Trends in Neurosciences*, 32: 41–47.
- Buljubasic, N., Rusch, N. J., Marijic, J., Kampine, J. P. and Bosnjak, Z. J. (1992). Effects of halothane and isoflurane on calcium and potassium channel currents in canine coronary arterial cells. *Anaesthesiology*, 96 (6): 990–998.
- Casha, S., Yu, W. R. and Fehlings, M. G. (2001). Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *The Journal of Neuroscience*, 103:203–218.
- Choo, A. M., Liu, J., Lam, C. K., Dvorak, M., Tetzlaff, W. and Oxland, T. R. (2007). Contusion, dislocation, and distraction: primary hemorrhage and membrane permeability in distinct mechanisms of spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery*, 6:255–266.
- Chung, J., Kim, M. H., Yoon, Y. J., Kim, K. H., Park, S. R. and Choi, B. H. (2014). Effects of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on glial scar formation after spinal cord injury in rats. *Journal of Neurosurgery. Spine*, 21(6): 966–973.
- Clause, B. T. (1993). The Wistar Rat as a right choice: establishing mammalian standards and the ideal of a standardized mammal. *Journal of the history of biology*, 26(2): 329–349.
- Crowe, M. J., Bresnahan, J. C. and Shuman, S. L. (1997). Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nature Medicine*, 3:73–76.
- Dumont, R. J., Okonkwo, D. O., Verma, S., Hurlbert, R. J., Boulos, P. T., Ellegala, D. B. and Dumont, A. S. (2001). Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clinical Neuropharmacology*, 24: 254–256.
- Dunham, K. A., Siriphorn, A., Chompoopong, S. and Floyd, C. L. (2010). Characterization of a graded cervical hemicontusion spinal cord injury model in adult male rats. *Journal of neurotrauma*, 27(11): 2091–2106.

- Eng, L. F. (1985). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *Journal of neuroimmunology*, 8(4–6):203–14.
- Fehlings, M. G., Sekhon, L. H. and Tator, C. (2001). The role and timing of decompression in acute spinal cord injury: what do we know? What should we do? *Spine*, 26: S101–110.
- Grasshoff, C. and Antkowiak, B. (2006). Effects of isoflurane and enflurane on GABA_A and glycine receptors contribute equally to depressant actions on spinal ventral horn neurones in rats. *British Journal of Anaesthesia*, 97 (5): 687–694.
- Gruner, J. A. (1992). A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *Journal of Neurotrauma*, 9(2): 123–128.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C. and Jorris, J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 32(1), 77–88.
- Hausmann, O. N. (2003). Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal cord*, 41(7): 369.
- Heimbürger, R. F. (2005). Return of function after spinal cord transection. *Spinal Cord*, 43(7): 438–440.
- Hendrix, S. and Nitsch, R. (2007). The role of T helper cells in neuroprotection and regeneration. *Journal of Neuroimmunology*, 184: 100–112.
- Hesp, Z. C., Goldstein, E. Z., Miranda, C. J., Kaspar, B. K. and McTigue, D. M. (2015). Chronic oligodendrogenesis and remyelination after spinal cord injury in mice and rats. *Journal of Neuroscience*, 35(3): 1274–1290.
- Hukuda, S. and Wilson, C. B. (1972). Experimental cervical myelopathy: effects of compression and ischemia on the canine cervical cord. *Journal of Neurosurgery*, 37(6): 631–652.
- Iwanami, A., Yamane, J., Katoh, H., Nakamura, M., Momoshima, S., Ishii, H., Tanioka, Y., Tamaoki, N., Nomura, T., Toyama, Y. and Okano, H. (2005). Establishment of Graded Spinal Cord Injury Model in a Nonhuman Primate: The Common Marmoset. *Journal of Neuroscience Research*, 80: 172–181.
- Jakeman, L. B., Guan, Z., Wei, P., Ponnappan, R., Dzwonczyk, R., Popovich, P. G. and Stokes, B. T. (2000) Traumatic spinal cord injury produced by controlled contusion in mouse. *Journal of Neurotrauma*, 17(4): 299–319.
- Jamme, I., Petit, E., Divoux, D., Gerbi, A., Maixent, J. M. and Nouvelot, A. (1995). Modulation of mouse cerebral Na⁺/K⁺-ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport*, 7(1): 333–337.
- Jia, Z., Zhu, H., Li, J., Wang, X., Misra, H. and Li, Y. (2012). Oxidative stress in spinal cord injury and antioxidant-based intervention. *Spinal Cord*, 50(4): 264.
- Jones, M. V., Brooks, P. A. and Harrison, N. L. (1992). Enhancement of gamma-aminobutyric acid-activated Cl⁻ currents in cultured rat hippocampal neurones by three volatile anaesthetics. *The Journal of Physiology*, 449: 279–293.
- Khan, T., Harvey, R. M., Sayers, S. T., Patwardhan, A. and King, W. W. (1999). Animal models of spinal cord contusion injuries. *Laboratory animal science*, 49(2): 161–172.

- Kim, S. Y., Kwon, O. J. and Park, J. W. (2001). Inactivation of catalase and superoxide dismutase by singlet oxygen derived from photoactivated dye. *Biochimie*, 83(5): 437–344
- Klakeel, M., Thompson, J., Srinivasan, R. and McDonald, F. (2015). Anterior spinal cord syndrome of unknown etiology. *Proceedings (Baylor University. Medical Center)*, 28(1):85–87.
- Krishna, V., Andrews, H., Jin, X., Yu, J., Varma, A., Wen, X. and Kindy, M. (2013). A contusion model of severe spinal cord injury in rats. *Journal of Visualized Experiments*, (78): 50111.
- Kwon, B. K., Hillyer, J. and Tetzlaff, W. (2010). Translational research in spinal cord injury: a survey of opinion from the SCI community. *Journal of Neurotrauma*, 27(1): 21–33.
- Lee, D. H. and Lee, J. K. (2013). Animal models of axon regeneration after spinal cord injury. *Neuroscience Bulletin*, 29(4): 436–444.
- Lee, J., Satkunendrarajah, K. and Fehlings, M. G. (2012). Development and characterization of a novel rat model of cervical spondylotic myelopathy: the impact of chronic cord compression on clinical, neuroanatomical, and neurophysiological outcomes. *Journal of Neurotrauma*, 29(5): 1012–1027.
- Lee, S. M., Yune, T. Y., Kim, S. J., Park, D. O. W., Lee, Y. K., Kim, Y. C., Oh, Y. J., Markelonis, G. J. and Oh, T. H. (2003). Minocycline reduces cell death and improves functional recovery after traumatic spinal cord injury in the rat. *Journal of Neurotrauma*, 20:1017–1027.
- Lemon, R. N., Kirkwood, P. A., Maier, M. A., Nakajima, K. and Nathan, P. (2004). Direct and indirect pathways for corticospinal control of upper limb motoneurons in the primate. *Progress in brain research*, 143: 263–279.
- Lewis, J. W. (1985) Buprenorphine. *Drug and alcohol dependence*, 14: 363–372.
- Liu, D., Xu, G. Y., Pan, E. and McAdoo, D. J. (1999). Neurotoxicity of glutamate at the concentration released upon spinal cord injury. *Neuroscience*, 93(4): 1383–1389.
- Liu, S., Ruenes, G. L. and Yeziarski, R. P. (1997a). NMDA and non-NMDA receptor antagonists protect against excitotoxic injury in the rat spinal cord. *Brain research*, 756(1–2): 160–167.
- Liu, X. Z., Xu, X. M., Hu, R., Du, C., Zhang, S. X., McDonald, J. W., Dong, H. X., Wu, Y. J., Fan G. S., Jacquin M. F., Hsu, C. Y. and Choi, D. W. (1997). Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 17:5395–5406.
- Marcol W., Slusarczyk, W., Gzik, M., Larysz-Brysz, M., Bobrowski, M., Gryniewicz-Bylina, B., Rosicka, P., Kalita, K., Węglarz, W., Barski, J. J., Kotulska, K., Labuzek, K. and Lewin-Kowalik, J. (2012). Air Gun Impactor—A Novel Model of Graded White Matter Spinal Cord Injury in Rodents. *Journal of reconstructive microsurgery*, 28(08), 561–568.
- McTigue, D. M. (2008). Potential therapeutic targets for PPAR γ after spinal cord injury. *PPAR Research*, 517162.
- Metz, G. A. and Whishaw, I. Q. (2009). The Ladder Rung Walking Task: A Scoring System and its Practical Application. *Journal of Visualized Experiments*, 28(6), 1–4.

- Metz, G. A. S., Curt, A., Van de Meent, H., Klusman I., Schwab, M. E. and Dietz, V. (2000). Validation of the weight-drop contusion model in rats: a comparative study of human spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, 17(1): 1–23.
- Metz, G., A. and Whishaw, I. Q. (2002). Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and coordination. *Journal of Neuroscience Methods*, 115(2), 169–179.
- Ng, M. T., Stammers, A. T. and Kwon, B. K. (2011). Vascular disruption and the role of angiogenic proteins after spinal cord injury. *Translational stroke research*, 2(4): 474–491.
- Onifer, S. M., Rabchevsky, A. G. and Scheff, S. W. (2007). Rat Models of Traumatic Spinal Cord Injury to Assess Motor Recovery. *ILAR (Institute for laboratory animal research) Journal*, 48 (4): 385–395.
- Pearse, D. D., Lo, T. P., Cho, K. S., Lynch, M. P., Garg, M. S., Marcillo, A. E., Sanchez, A. R., Cruz, Y. and Dietrich, W. D. (2005). Histopathological and behavioral characterization of a novel cervical spinal cord displacement contusion injury in the rat. *Journal of neurotrauma*, 22(6): 680–702.
- Poon, P. C., Gupta, D., Shoichet, M. S. and Tator, C. H. (2007). Clip compression model is useful for thoracic spinal cord injuries: histologic and functional correlates. *Spine (Phila Pa 1976)*, 32(25): 2853–2859.
- Popovich, P. G., Wei, P. and Stokes, B. T. (1997). Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *Journal of Comparative Neurology*, 377: 443–464.
- Randall, L. O. and Selitto, J. J. (1957). A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, 111, 409–419.
- Rivlin, A. and Tator, C. (1978). Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surgical Neurology*, 10: 38.
- Roeling, T. A., Doctor, G. J., Voorn, P., Melchers, B. P., Wolters, E. C. and Groenewegen, H. J. (1995). Effects of unilateral 6-hydroxydopamine lesions on neuropeptide immunoreactivity in the basal ganglia of the common marmoset, *Callithrix jacchus*, a quantitative immunohistochemical analysis. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 9(3), 155–164.
- Ruzicka, J., Urdzikova Machova, L., Kloudova, A., Amin, G. A., Vallova, J., Kubinova, S., Schmidt, M. H., Jhanwar-Uniyal, M. and Jendelova, P. (2018). Anti-inflammatory compound curcumin and mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injury in rats. *Acta Neurobiologiae Experimentalis Journal*, 78(4): 358–374.
- Scheff, S. W., Rabchevsky, A. G., Fugaccia, I., Main, J. A. and Lumpkin Jr., J. E. (2003). Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device. *Journal of neurotrauma*, 20(2): 179–193.
- Schmitt, C., Miranpuri, G. S., Dhodda, V. K., Isaacson, J., Vemuganti, R. and Resnick, D. K. (2006). Changes in spinal cord injury-induced gene expression in rat are strain-independent. *The spine journal: official journal of the North American Spine Society*, 6(2): 113–119.
- Schreiber, M. and Trojan, S. (1990). The effect of ascorbic acid administration on its levels in the brain tissue in intact and hypoxic 18-day-old rats. *Sbornik lekarsky*, 92 (2–3): 85–88.

- Sener, G., Toklu, H., Kapucu, C., Ercan, F., Erkanli, G., Kavkaz, A., Tilki, M. and Yegen, B. C. (2005). Melatonin protects against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Surgery today*, 35 (1): 52–59.
- Simon, M. C., Sharif, S., Tan P. R. and LaPlaca, C. M. (2009). Spinal Cord Contusion Causes Acute Plasma Membrane Damage. *Journal of Neurotrauma*, 26: 546–574.
- Sofroniew, M. V. (2005). Reactive astrocytes in neural repair and protection. *The Neuroscientist*, 11(5):400–407.
- Sofroniew, M. V. (2014). Astrogliosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(2): a020420.
- Sofroniew, M. V. and Vinters H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1): 7–35.
- Surai, P. F., Speake, B. K., Noble, R. C. and Sparka, N. H. (1999). Tissue-specific antioxidant profiles and susceptibility to lipid peroxidation of the newly hatched chick. *Biological trace element research*, 68 (1): 63–78.
- Svobodova, B., Kloudova, A., Ruzicka, J., Kajtmanova, L., Navratil, L., Sedlacek, R., Suchy, T., Jhanwar-Uniyal, M., Jendelova, P. and Machova Urdzikova, L. (2019). The effect of 808 nm and 905 nm wavelength light on recovery after spinal cord injury. *Scientific Reports*, 9(1): 7660–7660.
- Talac, R., Friedman, J. A., Moore, M. J., Lu, L., Jabbari, E., Windebank, A. J., Currier, B. L. and Yaszemski, M. J. (2004).). Animal models of spinal cord injury for evaluation of tissue engineering treatment strategies. *Biomaterials*, 25(9): 1505–1510.
- Tanhoffer, A. R., Yamazaki, K. R., Nunes, A. E., Pchevozniki, I. A., Pchevozniki, M. A., Nogata, C., Aikawa, J., Bonatto, J. S., Brito, G., Lissa, D. M. and Fernandes, C. L. (2007). Glutamine concentration and immune response of spinal cord-injured rats. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 30: 140–146.
- Tarlov, I., Klinger, H. and Vitale, S. (1953). Spinal cord compression studies: I. experimental techniques to produce acute and gradual compression. *A.M.A. archives of neurology & psychiatry*, 70: 813.
- Totoiu, M. O. and Keirstead, H. S. (2005). Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination. *The journal of comparative neurology*, 486(4): 373–383.
- Urdzikova Machova, L., Ruzicka, J., LaBagnara, M., Karova, K., Kubinova, S., Jirakova, K., Murali, R., Sykova, E., Jhanwar-Uniyal, M. and Jendelova, P. (2014). Human mesenchymal stem cells modulate inflammatory cytokines after spinal cord injury in rat. *International Journal of Molecular Sciences*, 27(1): 21–33.
- Vanicky, I., Urdzikova, L., Saganova, K., Cizkova, D. and Galik, J. (2001). A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. *Journal od neurotrauma*, 18: 1399–1407.
- Verdu, E., Garcia-Alias, G., Fores, J., Vela, J. M., Cuadras, J., Lopez-Vales, R. and Navarro, X. (2003). Morphological characterization of photochemical graded spinal cord injury in the rat. *Journal of neurotrauma*, 20(5): 483–499.
- Verkhatsky, A., Rodríguez, J. J. and Parpura, V. (2013). Astroglia in neurological diseases. *Future neurology*, 8(2): 149–158.

Vierck, C. J., King, C. D., Berens, S. A. and Yeziarski, R. P. (2013). Excitotoxic injury to thoracolumbar gray matter alters sympathetic activation and thermal pain sensitivity. *Experimental brain research*, 231(1): 19–26.

von Euler, M., Akesson, E., Samuelsson, E. B., Seiger, A. and Sundstrom, E. (1996). Motor performance score: a new algorithm for accurate behavioral testing of spinal cord injury in rats. *Experimental neurology*, 137(2): 242–254.

Westergren, H., Farooque, M., Olsson, Y. and Holtz, A. (2001). Spinal cord blood flow changes following systemic hypothermia and spinal cord compression injury: an experimental study in the rat using Laser–Doppler flowmetry. *Spinal Cord*, 39:74–84.

Xu, W., Chi, L., Xu, R., Ke, Y., Luo, C., Cai, J., Qiu, M., Gozal, D. and Liu, R. (2005). Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury. *Spinal Cord*, 43(4): 204.

Yeziarski, R. P., Liu, S., Ruenes, G. L., Kajander, K. J. and Brewer, K. L. (1998). Excitotoxic spinal cord injury: behavioral and morphological characteristics of a central pain model. *Pain*, 75(1): 141–155.

Young, W. (1993). Secondary injury mechanisms in acute spinal cord injury. *Journal of Emergency Medicine*, 11 Suppl 1:13–22.

Zhang, C., Yuan, X. R., Li, H. Y., Zhao, Z. J., Liao, Y. W., Wang, X. Y., Su, J., Sang, S. S. and Liu, Q. (2014). Downregulation of dynamin–related protein 1 attenuates glutamate-induced excitotoxicity via regulating mitochondrial function in a calcium dependent manner in HT22 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(1): 138–143.

Zhang, N., Yin, Y., Xu, S. J., Wu, Y. P. and Chen, W. S. (2012). Inflammation & apoptosis in spinal cord injury. *The Indian journal of medical research*, 135(3): 287–296.

Zhang, Y. K., Liu, J. T., Peng, Z. W., Fan, H., Yao, A. H., Cheng, P., Liu, P., Ju, G. and Kuang, F. (2013). Different TLR4 expression and microglia/macrophage activation induced by hemorrhage in the rat spinal cord after compressive injury. *Journal of neuroinflammation*, 10: 112.

Odborná literatura – knihy

Young, W. (2009). MASCIS spinal cord contusion model. *Animal Models of Acute Neurological Injuries*, Springer: 411–421.

Kramer, A. and W. Behrens–Baumann W (eds): *Antiseptic Prophylaxis and Therapy in Ocular Infections*. Basel, Karger, 2002, vol 33, pp 212–222.

Liverman T. C., Altevogt, M. B., Joy, E. J., Johnson, T. R. (2005). *Spinal cord injury: progress, promise, and priorities*. National Academy of Sciences. N.W. Washington, DC. 30–64.

Squire, L., Berg, D., Bloom, F., du Lack, S., Ghosh, A. and Spitzer N. (2008). *Fundamental Neuroscience*. Copyright © 2008, Elsevier Inc.

Internetové zdroje

<https://www.netterimages.com/> citováno z webových stránek dne 19.9.2019

<https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience> citováno z webových stránek dne 19.9.2019

Seznam obrázků

Obrázek 1.

- (A) Přední pohled na míchu (převzato a upraveno z Bican et al., 2013 dle www.netterimages.com).
- (B) Zadní pohled na míchu (převzato a upraveno z Bican et al., 2013 dle www.netterimages.com).

Obrázek 2. Schématické znázornění vztahů mezi jednotlivými nervy a anatomickými strukturami (převzato a upraveno z Bican et al., 2013 dle www.netterimages.com)

Obrázek 3. Schématické znázornění rozložení jednotlivých dermatomů lidského těla (převzato z Bican et al., 2013 dle Squire et al., 2003).

Obrázek 4. Schématický příčný řez znázorňující rozdíly rozložení bílé a šedé hmoty v jednotlivých míšních segmentech (převzato a upraveno z <https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience>).

Obrázek 5. Schéma podélného řezu míchy potkana (převzato a upraveno z Becker et al. 2003).

Obrázek 6. Schéma zachycující primární a sekundární poranění (převzato a upraveno z Anwar et al. 2016).

Obrázek 7.

- (A) Fotografie aneurysmální svorky, která se využívá pro vytvoření svorkového modelu SCI (převzato a upraveno z Cheriyan et al., 2014 dle Poon et al., 2007).
- (B) Schématický diagram kalibrované komprese (převzato a upraveno z Cheriyan et al., 2014).

Obrázek 8.

- (C) Ukázka katétru s na konci umístěným balónkem, který se dá použít pro vytvoření balónkového modelu SCI (převzato z Cheriyan et al., 2014).
- (D) Fotografie zobrazující velikost obratle T9 a porovnání s velikostí nafouklých balóneků na 10, 15 a 20 μ l fyziologickým roztokem (měřítko na pravé straně je v centimetrech) (upraveno dle Vanický et al., 2001).

Obrázek 9. Schéma ukazující místo laminektomie, polohu katétru a velikost segmentu odříznutého pro histologické zpracování – zákrok byl proveden z dorsální strany (převzato a upraveno z Vanický et al., 2001).

Obrázek 10. Grafické schéma znázorňující průběh pokusu

Obrázek 11. Mikromanipulátor, do kterého byla umístěna injekční stříkačka Hamilton 50 μ l během zákroku.

Obrázek 12. Katétr s nenafouknutým balónkem a vyznačenou značkou, po kterou byl katétr zasunut do epidurálního prostoru. Fotografie pořízená operačním mikroskopem značky ZEISS.

Obrázek 13. Fotografie potkana s vyholenými zády, dýchací maskou na čumáku a ukázkou některých chirurgických nástrojů použitých při operaci.

Obrázek 14. Detailnější pohled na rozstříženou kůži na začátku zákroku.

Obrázek 15. Fotografie ukazující detail na odstraněný trn obratle Th10 – označené šipkou

Obrázek 16. Fotografie ukazující detail na odhalenou míchu a katétr (označené šipkou), který je již až po značku zasunutý do epidurálního prostoru, jelikož jde o ventrální lézi, tak se katétr vsunuje ze strany a zespoda.

Obrázek 17. Schéma ukazující zasunutí balónku tak, aby výsledkem byla ventrální léze.

Obrázek 18. Fotografie ukazující detail na zakrytí míchy sešitím vnitřní vrstvy zádoových svalů.

Obrázek 19. Fotografie ukazující konec operace, kdy je rána zašitá a stehy jsou pokryté Novikovým roztokem.

Obrázek 20.

- (A) Představuje otevřenou arénu pro BBB test.
- (B) Zdravý potkan v BBB aréně.

(C, D) Zvíře po zákroku v BBB aréně.

Obrázek 21. Pohyblivá infračervená lampa – generátor tepelných stimulů.

Obrázek 22. Akrylový box, do kterého byli umisťováni potkani během testování.

Obrázek 23. Detail tlapky a pohyblivé lampy během testování.

Obrázek 24. Počítač zaznamenávající čas, jak dlouho potkan vydržel tepelnou stimulaci, než podnět začal vnímat jako bolest.

Obrázek 25. Obrázek ukazující celkový pohled na Plantar test.

Obrázek 26. Schématické naznačení aparatury pro *ladder walking* test (převzato z Metz & Whishaw, 2009).

Obrázek 27. Fotografie aparatury, ve které byli potkani testováni.

Obrázek 28. Fotografie nepravidelně rozmístěných kovových příček, po kterých potkan chodí.

Obrázek 29. Fotografie ukazující postranní zrcadla, díky kterým lze sledovat potkana ze všech stran.

Obrázek 30. Kamera zaznamenávající pohyb potkana a kolejnice, po které se kamera pohybuje.

Obrázek 31. Pohled na aparaturu pro *Ladder walking* test.

Obrázek 32. *Total miss*. (hodnotící škála pro *Ladder walking* test)

Obrázek 33. *Slight slip*. (hodnotící škála pro *Ladder walking* test)

Obrázek 34. *Partial placement*. (hodnotící škála pro *Ladder walking* test)

Obrázek 35. Zachování šedé a bílé hmoty míšni na histologických řezech, které ukazují rozdíly mezi jednotlivými skupinami a zároveň rozdíly na úrovních jednotlivých řezů.

Obrázek 36. Měření velikosti gliové jizvy kolem centrální dutiny.

Obrázek 37. Snímek z mikroskopu ZEISS AXIO Observer D1 (Carl Zeiss, Weimar, Německo) ukazující barvení motoneuronů (označeny šipkou) pomocí ChAT.

Seznam grafů

Graf 1. BBB skóre měřené na levé noze po dobu 5 týdnů po SCI.

Graf 2. BBB skóre měřené na pravé noze po dobu 5 týdnů po SCI.

Graf 3. Plantar test měřící čas, po kterém dojde k odtažení levé končetiny po aplikaci tepelného stimulu.

Graf 4. Plantar test měřící čas, po kterém dojde k odtažení pravé končetiny po aplikaci tepelného stimulu.

Graf 5. Plantar test měřící čas, po kterém dojde k odtažení pravé končetiny po aplikaci tepelného stimulu.

Graf 6. Plocha zachované šedé hmoty.

Graf 7. Plocha zachované bílé hmoty.

Graf 8. Velikost gliové jizvy vyjádřená jako procentuální podíl celkové plochy transversálního míšního řezu u zvířat 5 týdnů po SCI.

Graf 9. Celkový počet motoneuronů spočítaný na transversálních míšních řezech u zvířat 5 týdnů po SCI.

Seznam tabulek

Tabulka 1. Shrnující tabulka: Přehled testovaných skupin, počtu zvířat v jednotlivých skupinách a zákroků.

Tabulka 2. Data a směrodatné odchylky a vyznačení signifikancí ke grafu číslo 1.

Tabulka 3. Data a směrodatné odchylky a vyznačení signifikancí ke grafu číslo 2.

Tabulka 4. Data a směrodatné odchylky ke grafu číslo 3.

Tabulka 5. Data, směrodatné odchylky a vyznačení signifikancí ke grafu číslo 4.

Tabulka 6. Data, směrodatné odchylky a vyznačení signifikancí ke grafu číslo 5.

Tabulka 7. Data, směrodatné odchylky a vyznačení signifikancí ke grafu číslo 6.

Tabulka 8. Data, směrodatné odchylky a vyznačení signifikancí ke grafu číslo 7.

Tabulka 9. Data, směrodatné odchylky a vyznačení signifikancí ke grafu číslo 8.

Tabulka 10. Data, směrodatné odchylky a vyznačení signifikancí ke grafu číslo 9.